UNIVERSITÉ SCIENTIFIQUE ET MÉDICALE DE GRENOBLE

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 1972 **N° 1**

SUR UNE CARYOPHYLLACEE MEDICINALE SPERGULARIA RUBRA (L.) J. et C. PRESL

ETUDE DES C GLYCOFLAVONOIDES

THESE

présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN PHARMACIE *(Diplôme d'Etat)*

par

Anne ZOLL

Soutenue publiquement le 8 Janvier 1972 devant la commission d'examen

JURY :	M. R. PARIS	Président
	Mme A.-M. DEBELMAS	Rapporteur
	M. A. BOUCHERLE	Assesseurs
	M. J. CHOPIN	
	M. G. NOUVEL	
	Mme A. VERAIN	

UNIVERSITÉ SCIENTIFIQUE ET MÉDICALE DE GRENOBLE

UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 1972 N° 1

SUR UNE CARYOPHYLLACEE MEDICINALE SPERGULARIA RUBRA (L.) J. et C. PRESL

ETUDE DES C - GLYCOFLAVONOIDES

T H E S E

présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN PHARMACIE *(Diplôme d'Etat)*

par

Anne ZOLL

Soutenue publiquement le 8 Janvier 1972 devant la commission d'examen

JURY :	M. R. PARIS	Président
	Mme A.-M. DEBELMAS	Rapporteur
	M. A. BOUCHERLE	Assesseurs
	M. J. CHOPIN	
	M. G. NOUVEL	
	Mme A. VERAIN	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A mon père

A tous ceux
qui me sont chers.

A Monsieur le Professeur R. P A R I S

Professeur de Matière Médicale

à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

de l'Université René Descartes (Paris V)

Directeur du Laboratoire National de la Santé Publique

Officier de la Légion d'Honneur

qui nous a fait le grand honneur

d'accepter la Présidence de cette Thèse

nous adressons l'expression de

notre respectueuse gratitude.

Aux membres de notre jury

Madame le Professeur A. M. DEBELMAS

Professeur de Matière Médicale

à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Grenoble

Monsieur le Professeur A. BOUCHERLE

Professeur de Chimie et de Toxicologie

à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Grenoble

Monsieur le Professeur J. CHOPIN

Professeur de Chimie Biologique

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lyon

Monsieur le Professeur G. NOUVEL

Professeur de Pharmacie Galénique et de Pharmacognosie

à l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Dijon

Madame le Professeur A. VERAIN

Professeur de Pharmacie Galénique

à l'U.E.R. des Sciences PHarmaceutiques et Biologiques de Grenoble

qui ont accepté de juger ce travail,

en témoignage de notre reconnaissance.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544309_0036

A tous ceux qui, à des titres divers, se sont intéressés à notre travail et nous ont apporté leur précieuse collaboration :

à Monsieur le Professeur BIZOT

à Mademoiselle M. L. BOUILLANT

à Mademoiselle M. N. DURY

à Monsieur POINSOT, Directeur du Jardin Botanique

à tout le Personnel et à mes Collègues du Laboratoire de Pharmacie Galénique et de Pharmacologie de l'UER des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Dijon

à Monsieur FRIARD, Directeur de la Société Vitaflor

aux Laboratoires Dausse

à Monsieur le Directeur de la Société les "Bons Producteurs"

Nous adressons nos très sincères remerciements.

I N T R O D U C T I O N

La famille des Caryophyllacées (Dianthacées) comporte plus de 2 000 espèces réparties en 70 genres environ. Ces plantes, très cosmopolites, poussent cependant plus particulièrement dans les régions froides ou tempérées de l'hémisphère Nord. Les Caryophyllacées sont bien représentées dans la flore française (150 espèces environ), mais elles ne fournissent que fort peu de plantes à la thérapeutique.

La Saponaire elle-même (*Saponaria officinalis* L.) très prisée des anciens et qui a joui "sur le continent" selon l'expression des phytothérapeutes anglais (1), d'une grande réputation comme diurétique, dépuratif, expectorant, diaphorétique, ne subsiste plus qu'à la Pharmacopée allemande (2). A l'édition de 1884 du Codes français (3a) figuraient les feuilles de Saponaire ; la souche radicante qui existait encore à l'édition de 1949 (3b), n'est plus inscrite à l'Edition 1965 de notre Pharmacopée (3c). Les précis de phytothérapie disent toujours grand bien de cette plante et conseillent son emploi (4) (5) (6) (7). Mais il est curieux de

(1) TREASE (G.E.) Pharmacognosy (1961),p. 250
(2) D.A.B. 7 (1964) RADIX SAPONARIAE - Seifenwurzel - IIIe Suppl. 1966
(3) Pharmacopée française a) Ed. 1884
b) Ed. 1949
c) Ed. 1965
(4) GARNIER (G.) et coll. Ressources médicinales de la flore française I, p. 408
(5) LECLERC (H.) Précis phytothérapie (1966, p. 86
(6) TROUARD-RIOLLE (Y.) Les plantes médicinales (1964), p. 79
(7) VALNET (J.) Docteur Nature (1971), p. 424

constater que ni la Saponaire, ni aucune autre Caryophyllacée, n'entre dans la composition des nombreuses formules indiquées par MESSEGUE à la fin de son livre (8).

Les propriétés physiologiques de la Saponaire sont attribuées à la présence d'un saponoside triterpénique dont le pouvoir aphrogène fait également utiliser la plante comme détergent. Les noms Saponaria, Saponoside, dérivent d'ailleurs du latin Sapo : savon, et les noms vernaculaires de la Saponaire rappellent la "propriété moussante" de la drogue : Herbe à savon - Seifenkraut - Soapwort - Herbasaponale.

Les saponosides semblent exister de façon assez constante chez les Caryophyllacées (9). Plusieurs espèces de Gypsophila (10) (11) (2) et d'Ankyropetalum (10) sont assez riches pour servir à l'extraction des saponines commerciales utilisées comme émulsionnant et comme détergent. Sous le nom de Polygala de Syrie, la racine de *Spergularia marginata* Kittel (*Sp. media* var *marginata* G.G.) autre Caryophyllacée très riche en saponosides, est signalée par diverses pharmacopées (3c) comme falsification des racines de *Polygala Senega* L. Cette Spergularia dont nous reparlerons a été étudiée par R. PARIS et P. LYS (12).

Aux saponosides également serait due l'action diurétique, antiseptique, cholérétique, des quelques autres Caryophyllacées employées en médecine populaire. La présence de ces constituants peut d'ailleurs conférer à la drogue une certaine toxicité (12) (13) (9) (4).

(8) MESSEGUE (M.) Des hommes et des plantes. LAFFONT, 1970.
(3c) Pharm. frcse Ed. 65, p. 831
(9) BOITEAU (P.B.P.) et coll. Les triterpènes..., 1964, p. 804-809
(10) PARIS (R.R.), MOYSE (H.) "Précis de matière médicale" II, p. 134
(11) STEINEGGER (E.) et coll. Lehrbuch des Allgemeinen Pharmacognosie, 1963, p. 240
(12) PARIS (R.R.) et coll. Ann. Pharm. frcse, 1954, 12, p. 171-179
(13) PLANCHON (L.) et coll. Précis de matière médicale, 1946, Tome I, p. 886

Sous les noms de Sabline rouge, *Arenaria rubra* L., *Spergularia rubra* PRESL., on désigne une petite Caryophyllacée gazonnante à fleurs roses, recommandée en médecine populaire dans certaines affections des voies urinaires. Cette plante, anciennement connue puisque inscrite parmi les "substances tirées des végétaux et utilisées en nature" à l'Edition 1884 du Codex français, possède des propriétés diurétiques, calmantes, antiseptiques ; elle donne de bons résultats dans la cystite, les coliques néphrétiques, la gravelle. (4) (5) (6) (14) (15) (16) (17).

La Sabline rouge pousse assez communément dans les terrains secs et sablonneux, mais ce n'est pas une plante halophile comme certaines espèces voisines avec lesquelles elle est parfois confondues. Elle est fréquente dans toute l'Europe, excepté dans quelques régions au climat particulièrement rigoureux : Iles Féroé, Islante, Spitzberg (18). On la trouve aussi en Australie (19), en Amérique septentrionale (16). Elle est particulièrement abondante dans les régions méditerranéennes, à Malte, en Afrique du Nord où elle forme des tapis sur les terrains sablonneux et pierreux (20).

D'ailleurs, d'après PARIS (12) citant VIGIER (20), les premières études cliniques sur cette drogue auraient été faites par un médecin d'Alger le Docteur E. BERTHERAND en 1878 (21).

(3a) Pharm. frcse Ed. 1884, p. 37
(14) DECAUX (F.) Rev. Phytothérapie Jv 1952, p. 7 - 8
(15) COMPAIN Guide de l'herboriste (1930) cité par TROUARD-RIOLLE (Y.) (6) p. 61
(16) PERROT (Em.) "Mat. prem....." (1943-1944) I p. 794
(17) PERROT (Em.) PARIS (R.) Les plantes médicinales (1971), 1, p. 118
(18) Flora europaea (1964) I p. 155
(19) Flore de l'abbé COSTE (1901) p. 225
(20) VIGIER (F.) J. Pharm. Chim.,1879, 29, 4e série, p. 371-375
(21) BERTHERAND (E.) J. Pharm. Chim.,1878, 27, 4e série, p. 485-487

La venue en métropole des Français d'Algérie et du Maroc a contribué,ces dernières années,au renouveau de cette plante dans certaines régions où elle était tombée dans l'oubli. Actuellement, l'herboristerie française utilise 7 à 8 tonnes de Sabline rouge par an. Il s'agit uniquement de plantes de cueillette (*) venant surtout d'Algérie et du Maroc.

La drogue est presque exclusivement vendue en nature pour la préparation de tisanes simples et composées ; un seul laboratoire français utilise la Sabline rouge pour la fabrication d'extrait fluide (700 kg).

Un tel tonnage peut sembler bien modeste si on le compare aux 130 tonnes de feuilles d'Artichaut (22) entrant dans la composition de diverses spécialités, ou avec les 450 tonnes de tilleul bues en infusion par les Français. Néanmoins, la consommation de Sabline rouge est comparable à celle d'une autre drogue diurétique, les styles de Maïs, dont on utilise annuellement 6 à 10 tonnes. Les "queues de cerise" autre diurétique classique, sont d'une vente plus courante (environ 25 tonnes par an) (*)

Les essais préliminaires que nous avons effectués sur la Sabline rouge ont montré que l'étude de cette plante se révélait des plus intéressante dans les domaines chimique, botanique et pharmacodynamique.

(*) Renseignements fournis par les importateurs, les herboristes en gros et le "Syndicat national des producteurs, ramasseurs et collecteurs de plantes médicinales" à Milly-la-Forêt.

(22) PELT (J.M.) Prod. Probl. Pharm. (1966), 21, n° 9, 412-428

D'après MALAPERT (23), la Sabline rouge ne contient pas de saponosides.

L'indice de mousse réalisé selon la méthode de la Pharmacopée française (3c) est en effet très faible (inférieur à 100), bien que le pouvoir aphrogène du décocté ne soit pas négligeable. Il est certain que la présence de saponosides n'est pas responsable de l'action physiologique de la drogue comme dans le cas de la Saponaire ou de la Nielle des Blés.

Les coupes de racines, de tiges, de feuilles, montrent la présence d'une quantité importante d'oxalate de calcium en mâcles. La plante donne 8 à 9 % de cendres alcalines riches en potassium et en sodium. Les sels participent sûrement à l'action diurétique importante de la drogue, mais il doit exister d'autres constituants actifs.

La présence de flavonosides et plus particulièrement de C-glycoflavonoïdes chez la Saponaire (BARGER 1906) (24) nous a conduit à rechercher l'existence de tels composés chez la Sabline rouge.

Les C-glycoflavonoïdes se rencontrent chez les végétaux beaucoup plus fréquemment qu'on ne le pensait jusqu'à ces dernières années, mais leur présence serait significative car leur biogénèse semble différente de celles des O-glycoglavonoïdes (25) (26).

(23) MALAPERT (P.P.) J. Pharm., 1846, 3eS, 10, 339-344 cité par GARNIER et coll. p. 412 (4)
(24) BARGET (G.) J. Chem. Soc., (1906), 89, 1210-1224
(25) ALSTON (R.E.) in SWAIN (T.) Comparative phytochemistry (1966) chap. 3, p. 36
(26) ALSTON (R.E.) in Rec. adv. phytochem., vol.1, 1968, p. 319

D'un point de vue pratique ces composés possèdent l'avantage d'être résistants aux hydrolyses chimique et enzymatique, aussi les retrouve-t-on dans les préparations galéniques comme dans la plante sèche.

Il ne serait pas étonnant que beaucoup de Caryophyllacées, plantes appartenant à une famille archaïque, renferment des C-glycoflavonoïdes, puisque la C-glycosylation des composés flavoniques est considérée (27)(28) comme un caractère primitif en phylogénie.

Il est très difficile d'attribuer aux Caryophyllacées une place satisfaisante dans la classification si on se réfère aux seuls critères anatomiques et morphologiques.

Malgré la présence constante de fleurs bipérianthées, les Caryophyllacées ont été rangées par les botanistes modernes dans l'ordre des Curvembryales (Centrospermales) aux côtés de diverses apétales : ces botanistes, donnant au caractère embryologique une importante prépondérante, ont englobé dans l'ordre des Curvembryales toutes les familles dont la graine possède un embryon courbé en fer à cheval autour des tissus de réserve. (29).

Récemment, il a semblé préférable de donner la priorité à certains caractères chimiques. On sépare des Curvembryales-Centrospermales les familles contenant des pigments antho-

(27) HARBORNE (J.B.) in SWAIN (T.) Comp. phytoch., (1966) chap.16, p. 292
(28) HARBORNE (J.B.) Comp. biochem. of. flav. (1967) Chap.10, p.313
(29) BACH (D.) Cours Botanique. Tome II p. 195 ; Tome I p. 323.

cyaniques et flavoniques : on considère comme caractéristique des Centrospermales la présence de pigments azotés particuliers, les Bétalaines. Les familles qui contiennent exclusivement des Bétacyanines et des Bétaxanthines auraient eu, à partir d'une origine commune, une philogénèse parallèle mais différente de celles des autres Angiospermes (30) (31) (32).

Les Caryophyllacées possèdent des pigments anthocyaniques et des pigments flavoniques. Elles forment actuellement l'ordre des Caryophyllales avec la famille des Paronychiées qui est même, par certains auteurs, considérée comme une simple tribu des Caryophyllacées (33).

A l'intérieur même de la famille des Caryophyllacées, les disparités sont importantes. Les deux sous familles classiquement admises différent par plusieurs caractères morphologiques et embryologiques.

Les Silenoïdées ont un calice gamosépale, les pétales sont pourvus d'un onglet, et la placentation serait, pour certains, faussement centrale et dériverait d'un ovaire pluriloculaire à placentas axiles (29). Les Alsinoïdées,par contre,possèdent une

(30) MABRY (Tom. J.) in SWAIN (T.) Comp. phytochem. 1966, ch.14, p. 237-243
(31) MARBRY (Tom.J.) in Rec. adv. phytochem. 1967, p. 159
(32) HEGNAUER (R.) in Persp. in phytochem. 1969, p. 124
(33) PAX (F.) in ENGLER und PRANTL Die natürlichen Pflanzenfamilien. III, 1b, 61.

placentation de type nettement caulinaire assez proche, pour certains genres, de la placentation basilaire des Chénopodiacées. De plus, la fleur des Alsinoïdées possède un calice dialysépale et des pétales sans onglet.

Ces différences morphologiques et embryologiques entre les plantes appartenant aux deux sous familles des Caryophyllacées se reflètent-elles dans la composition chimique ?

Certains auteurs ont essayé déjà une différenciation fondée sur la présence d'un polyoside, la "lactosine" dont l'hydrolyse libérerait glucose, galactose, pentose (34). Cette tentative a été infructueuse. La nature des flavonosides présents chez les Caryophyllacées donnera peut-être des résultats plus satisfaisants.

Nous avons entrepris l'étude de la Sabline rouge dans cette optique.

Mais nous nous sommes heurtés dès l'abord à un problème d'identification botanique. La Sabline rouge a été rattachée à divers genres. Elle constitue d'autre part une espèce très polymorphe, hautement influencée par les conditions écologiques. Comme les plantes utilisées en herboristerie sont des plantes de cueillette en provenance de pays où les récolteurs ne possèdent pas toujours la qualification nécessaire, il est indispensable de pouvoir rapporter à une espèce définie les échantillons soumis à l'analyse.

(34) NETIEN (G.) Soc. Pharm. Lyon, 27 oct. 1943
Thèse Doctorat Sciences naturelles - Lyon 1935

La première partie de notre travail est donc consacrée à l'étude botanique de la drogue.

Nous exposerons ensuite les résultats de l'étude chimique, étude qui concerne essentiellement les flavonoïdes de la Sabline rouge. Nous exposerons également le début des recherches comparatives entreprises sur les flavonosides d'autres Caryophyllacées indigènes.

Dans une troisième partie, nous dirons quelques mots de l'action physiologique.

PLAN DU TRAVAIL

PREMIERE PARTIE : E T U D E B O T A N I Q U E

1 - Place de la Sabline rouge parmi les Caryophyllacées. p. 10.
2 - Description de *Spergularia rubra* (L.) J. et C. PRESL. p. 12.
3 - Caractères macroscopiques de la drogue. p. 13.
4 - Caractères microscopiques de la grogue. p. 14.
a) coupe de la tige
b) coupe de la racine
5 - Caractères des graines de *Spergularia rubra*. p. 19.

DEUXIEME PARTIE : E T U D E C H I M I Q U E

- TRAVAUX ANTERIEURS. p. 23.

- TRAVAUX PERSONNELS.
Chap. I - Choix du matériel végétal. p. 28.
Chap. II - Essais d'orientation. p. 29.
Chap. III - Cendres et dosage des principaux éléments minéraux p.3
Chap. IV - Essais d'isolement des Triterpènes. p. 36.
Chap. V - Etude des Flavonoïdes et de quelques autres polyphénol
p. 41. (voir plan détaillé de ce chapitre.)

TROISIEME PARTIE : I N T R O D U C T I O N à une E T U D E
P H A R M A C O L O G I Q U E

- Introduction. p. 160.
- Partie expérimentale. p. 163
1 - Toxicité du totum flavonique
2 - Action diurétique du totum flavonique de
la drogue totale

C O N C L U S I O N : p. 166.

A P P E N D I C E S :

- Solvants de chromatographie . p. 172
- Réactifs utilisés pour la révélation des chromatogrammes. p. 177

PREMIERE PARTIE

ETUDE BOTANIQUE

1 - PLACE DE LA SABLINE ROUGE PARMI LES CARYOPHYLLACEES

En herboristerie, la Sabline rouge est désignée sous le nom d'*Arenia rubra*. Ce nom figure aussi à l'édition de 1884 du Codex, (3 a.) mais il est suivi de celui de *Spergularia rubra* PERS.

Le nom de Sabline, comme celui d'Arenaria (du latin arena=sable) fait allusion au terrain d'élection de ces plantes qui poussent dans les sols sableux, siliceux. Le terme Spergularia est le diminutif de Spergula (non d'un genre très voisin) mot venant lui-même du latin Spargere = répandre, parce que ces plantes se répandent très rapidement grâce à leurs nombreuses graines.

Le genre Spergularia n'a pas été décrit par LINNE (1707-1778) mais plus tardivement par le botaniste C. H. PERSOON (1762-1836).

LINNE a décrit par ailleurs le genre Spergula, mais la Sabline rouge ne peut y être rangée car elle possède un gynécée à 3 carpelles surmontés de 3 styles libres, alors que les Spergula ont 5 styles et 5 carpelles. Néanmoins la Sabline rouge porte des feuilles stipulées comme les Spergula.

(3 a.) Pharm. frcse Ed. 1884 p. 37

Malgré la présence de stipules, et probablement en raison du gynécée tricarpellé, LINNE rapporte la Sabline rouge au genre Arenaria. Il précise cependant qu'il s'agit d'une Arenaria à feuilles stipulées : "foliis filiformibus, stipulis membranaceis vaginantibus" (Species plantarum 1re Edition 1753. Vol I p 423).

Ces stipules, absentes chez les autres Caryophyllacées, ont même conduit certains auteurs à inclure la Sabline rouge avec les autres Spergularia et les Spergula, dans les Paronychiacées (= Illécébracées). Ces dernières possèdent cependant un fruit monosperme indéhiscent, alors que les Spergularia et les Spergula possèdent le fruit capsulaire type des Caryophyllacées.

L'index de KEW (tome I p 180) indique que l'espèce linéenne *Arenaria rubra* est identique à *Spergularia rubra*, ce même Index de KEW (Tome II p 957) signale que ce sont les botanistes tchèques J. S.PRESL (1791-1849) et C. B.PRESL (1794-1852) qui en 1819 dans Flora Cechica (35) ont donné la diagnose de *Spergularia rubra*, en l'identifiant à l'*Arenaria rubra* de LINNE.

Les mêmes indications sont données par Flora europaea (18) qui précise également l'identité de *Spergularia rubra* (L.) J et C. PRESL avec *Spergularia campestris* L. ASCHERSON, qui constituait une des deux variétés signalées par LINNE.

Par contre, les botanistes modernes excluent de l'espèce type *Spergularia rubra*, la deuxième variété de LINNE, c'est-à-dire la variété *marina* qui, disait-il, "habitat in litoribus marini" alors que la variété *campestris*, "habitat in Europae arenosis collibus".

(35) PRESL (J.S.) PRESL (K.B.) Flora Cechica (1819) 8, XIV, p. 94

Malgré les très nombreuses synonymies signalées par l'Index de KEW, le problème semble donc assez facilement résolu :

La Sabline rouge appartient au genre Spergularia :

- présence de stipules
- 3 carpelles, 3 styles
- capsule s'ouvrant par 3 valves

On ne doit la rapporter :

ni au genre Arenaria :
- absence de stipules
- 3 carpelles, 3 styles
- capsule s'ouvrant seulement au sommet par 6 dents

ni au genre Spergula :
- présence de stipules
- 5 carpelles, 5 styles
- capsule s'ouvrant par 5 valves

D'ailleurs les pharmacognosistes modernes ont bien déterminé la "sabline rouge" comme étant *Spergularia rubra* PERS. (16-17).

Signalons cependant que F. PAX dans la flore de ENGLER et PRANTL (33) utilise comme nom de genre Tissa ADANS.à la place du nom de genre Spergularia PERS. Quant au RICHTER (36) il ne fait pas mention de l'existence d'un genre Spergularia, et il s'en tient aux dénominations de LINNE en compliquant la classification des sous espèces.

En nous inspirant de divers auteurs, nous pouvons maintenant donner une description de la plante utilisée sous le nom de Sabline rouge.

2 - DESCRIPTION DE *SPERGULARIA RUBRA* (L.) J.C. PRESL

Petite plante herbacée, généralement annuelle ou bisannuelle, rarement pérennante, pubescente-glanduleuse surtout dans

(36) RICHTER - Systema, genera, Species Plantarum. LINNE, 1840 p. 437

le haut. Racine et souche simples, faibles ou un peu charnues. Tiges assez grêles, couchées- étalées, diffuses, de 5 à 25 cm, dilatées aux noeuds. Feuilles ténues, linéaires, planes, opposées-décussées mais paraissant souvent pseudoverticillées vers la base des tiges à cause du développement de fascicules axillaires unilatéraux. Deux stipules interpétiolaires à chaque noeud, plus longues que larges, lancéolées, acuminées, argentées. Inflorescence en cymes courtes, lâches, bractées de l'inflorescence foliacées. Fleurs actinomorphes, pentamères. Sépales oblongs, verts avec des bandes scarieuses, mesurant 3 à 4 mm, égalant ou dépassant les pétales. Pétales uniformément roses. Etamines (5) 10. Ovaire uniloculaire tricarpellé à 3 styles dressés. Capsule polysperme, subglobuleuse, égalant le calice, s'ouvrant par 3 valves.

Graines non ailées, brun foncé, subtrigones, de 0,45 à 0,55 mm, à testa rugueux chagriné ou portant de petits tubercules.

Pousse dans le sable, mais pas dans les terrains salés.

3 - CARACTERES MACROSCOPIQUES DE LA DROGUE

Cette diagnose est assez précise pour éviter toute confusion de l'espèce linéenne *Spergularia rubra*, à l'état frais, avec d'autres Caryophyllacées voisines. Malheureusement *Spergularia rubra* arrive sèche en France, plus ou moins brisée, et les grossistes la vendent coupée. Il est néanmoins assez facile de vérifier, par un examen macroscopique simple, que l'on a affaire à une plante du genre Spergularia, en vérifiant la présence

- de feuilles stipulées
- d'un gynécée à 3 styles
- d'une capsule ne dépassant pratiquement pas le calice, s'ouvrant par 3 valves, et contenant de nombreuses graines.

4 - CARACTERES MICROSCOPIQUES DE LA DROGUE

L'examen des caractères microscopiques est généralement inutile. D'ailleurs les poils n'ont rien de caractéristique ; ce sont des poils secréteurs : le pied pluricellulaire unisérié est généralement à 3 cellules ; la tête monocellulaire est légèrement globuleuse (fig. 1 et 2).

a/ La coupe transversale de la tige de *Spergularia rubra*, est pratiquement identique à celle des plantes du genre Arenaria que nous avons examinées (*Arenaria serpyllifolia, Arenaria rotundifolia).*

On distingue :

1) - un épiderme à cuticule striée (fig. 2) avec stomates ; dans les tiges agées il existe une assise de collenchyme sous-épidermique.
2) - un parenchyme cortical avec des mâcles d'oxalate de calcium très volumineuses (fig. 3 et 4).
3) - un endoderme très nettement visible dans les tiges jeunes (fig.3).
4) - un péricycle en anneau continu plus ou moins développé selon l'âge de la tige (fig. 3 et 5) formé de deux zones concentriques de nature différente.

   La zone externe, scléreuse, est formée de 3 à 5 rangs de fibres à contours polygonaux, à parois épaisses finement canaliculées (fig. 6).

   La zone interne, plus ou moins parenchymateuse, se compose de 2 à 4 assises de cellules.

   Cet anatomie du péricycle est conforme à la description de MOROT (37) pour les tiges normales de Caryophyllacées.

(37) MOROT (L.) Ann. sciences nat. (Bot.)
6e série - 1885, 20, p. 281

Fig. 1

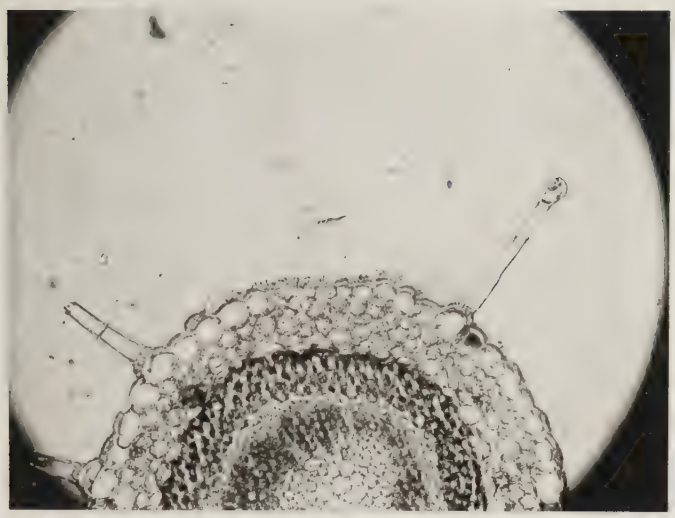


Fig. 2

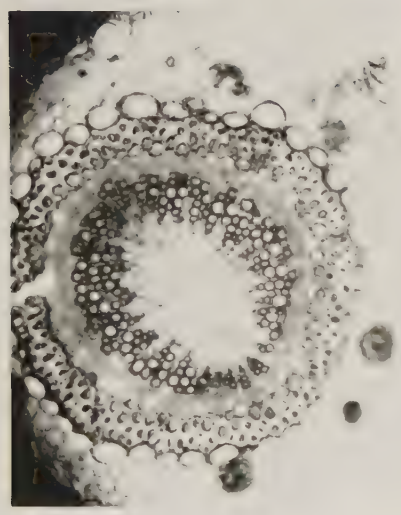


Fig. 3

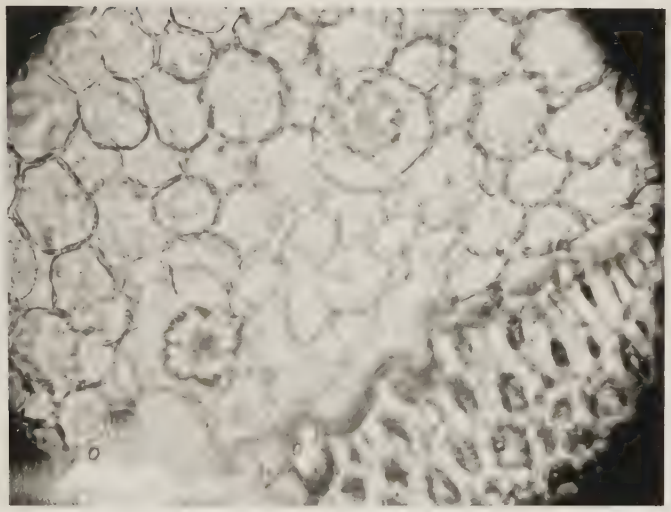


Fig. 4

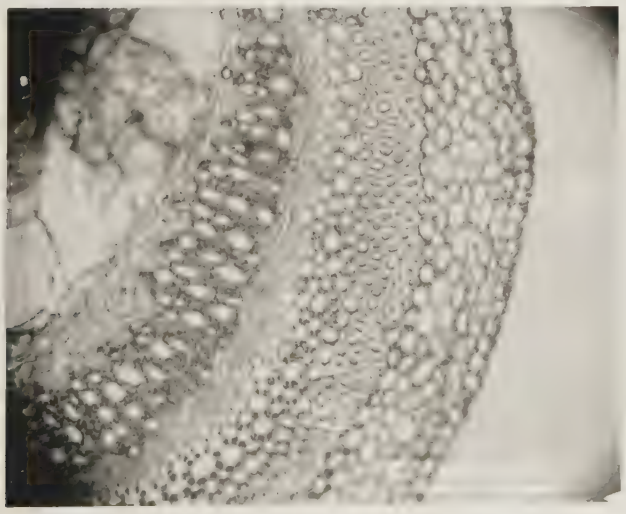


Fig. 5

5) - du liber secondaire

6) - du bois secondaire

7) - au centre, enfin, de grandes cellules parenchymateuses à parois minces, (fig. 3) en voie de lyse chez les tiges agées (fig. 5).

b/ La coupe de la racine de *Spergularia rubra* est plus caractéristique.

En effet, on y trouve des formations tertiaires plus ou moins importantes selon l'âge de la plante. Ces formations tertiaires, inhabituelles chez les Caryophyllacées,seraient caractéristiques du genre Spergularia. Nous n'en avons pas trouvé chez les Arenaria que nous avons examinées.

PARIS et LYS (12) ont trouvé cette même structure chez *Spergularia marginata* ; leur description s'applique bien à notre *Spergularia rubra*.

"Examinée au microscope, une coupe transversale de racine faite dans la région moyenne montre, vers l'extérieur, un suber peu épais à 2 ou 3 assises de cellules qui recouvre un parenchyme secondaire (phelloderme) à nombreux méats allant jusqu'au deux tiers du rayon, le centre étant occupé par un massif de bois secondaire avec un reste de faisceaux ligneux primaires.

Dans l'épaisseur du parenchyme secondaire se trouvent, disposés sur 2 ou 3 cercles concentriques plus ou moins réguliers, d'autres faisceaux libero-ligneux.."

La figure 7 montre la racine d'une plante jeune, avec un tout début de formation libero-ligneuse tertiaire (on distingue aussi une mâcle d'oxalate de calcium).

La figure 8 reproduit le détail d'une de ces jeunes formations tertiaires.

Les figures 9 et 10 montrent des racines plus âgées ayant respectivement 1 et 3 cercles de formations libero-ligneuses tertiaires.

PARIS et LYS, dans l'article déjà cité, disent que ces formations résultent "du fonctionnement d'assises génératrices surnuméraires analogues à celles dont l'existence avait déjà été signalée par MOROT (37) dans la racine de *Spergularia media*". PARIS indique également qu'une analyse détaillée de cette structure a été faite par JOESTING qui l'a retrouvée chez *Spergularia salina* et *Spergularia rubra*. Ce caractère histologique semble donc bien caractériser les Spergularia parmi les autres Caryophyllacées.

Par contre la présence de formations tertiaires dans la tige de Sp. media, semble être propre à cette seule espèce (37)

Malheureusement, les falsifications de la Saline rouge semblent venir essentiellement de confusion lors de la cueillette entre diverses espèces de Spergularia à habitats semblables et d'apparence voisine. Ces confusions sont difficiles à déceler.

La systématique du genre Spergularia est actuellement étudiée dans le cadre des Spergularia méditerranéennes et particulièrement des Spergularia du Maroc, par MONNIER (38) Nous ne sommes pas assez versée dans les questions de systématique pour pouvoir le suivre dans la détermination des sous-espèces ou des taxons infraspécifiques. Cependant la connaissance des différentes espèces de Spergularia d'Afrique du Nord nous intéresse particulièrement,

(38) MONNIER (P.) Nat. Monsp. 1968, fasc. 19, p. 87-113

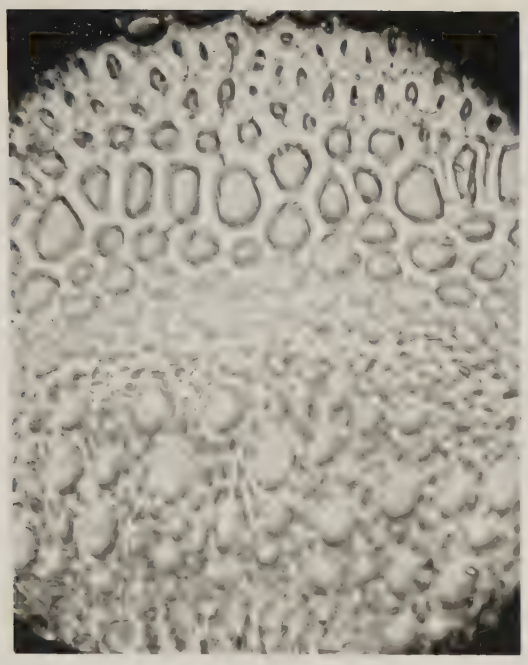


Fig. 6

Fig. 7

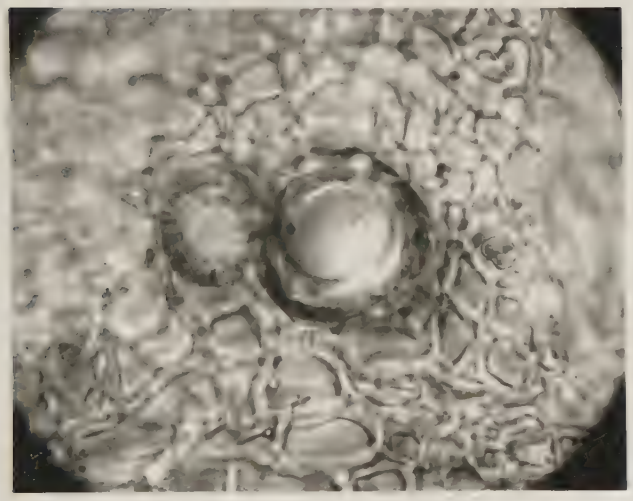


Fig. 8

Fig. 9

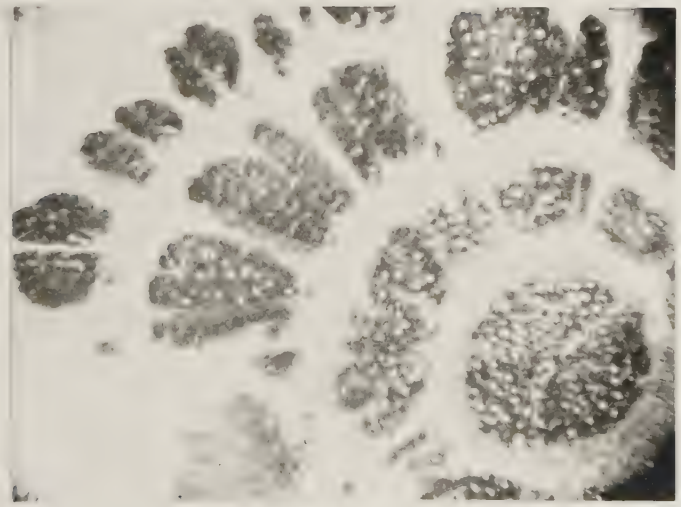


Fig. 10

puisqu'il s'agit de la principale région exportatrice. Or MONNIER affirme ne pas avoir trouvé au Maroc de *Spergularia rubra* (L.) J.C. PRESL variété α *campestris* de LINNE, c'est-à-dire de *Spergularia rubra* type. Ce pays fournit donc des espèces voisines.

De l'article de MONNIER nous avons retenu que :

la taille et l'apparence des stipules (argentés ou non),

l'apparence des feuilles (plus ou moins charnues, plus ou moins longues, plus ou moins fasciculées),

la taille des fleurs, leur couleur (plus ou moins rose),

les différences de coloration entre les fleurs du haut et du bas de la tige,

la présence de poils en plus ou moins grand nombre,

la taille de la capsule,

sont de bons critères d'identification, mais que les seuls critères véritablement rigoureux sont les caractères des graines observées à fort grossissement.

5 - CARACTERES DES GRAINES DE SPERGULARIA

L'identification de l'espèce par examen des graines est possible sur une plante sèche.

Nous avons examiné les graines des échantillons de *Sp. rubra* de diverses provenances qui sont en notre possession.

Sachant que *Sp. rubra* ne possède que des graines totalement aptères, nous avons pris comme critère :

- graines non ailées,
- graines à ailes très étroites ou partielles,
- graines largement ailées,

sans entrer dans le détail des ornementations de la graine et des ailes.

Parmi tous nos échantillons, deux seulement, sur une dizaine, ne possédaient que des graines aptères (fig. 13 et 14) de même apparence que celles provenant de la plante fraîche donnée par le Jardin botanique de Dijon.

Tous les autres échantillons comprenaient

soit un mélange de graines aptères et de graines partiellement ailées,

soit le plus souvent, un mélange de graines largement ailées (fig. 11 et 12) et de graines aptères.

La drogue appelée en herboristerie *Arenaria rubra* serait donc souvent un mélange de *Spergularia rubra* type, c'est-à-dire *Spergularia rubra* (L.) J. et C. PRESL avec des espèces voisines telles : *Spergularia salina* J. et C. PRESL, (correspondant pro parte à la variété β *marina* L. de *Arenaria rubra* L.) ou *Spergularia marginata* (D.C.) KITTEL (= *Spergularia media* (L) J. et C. PRESL.) *

Et même si les graines sont toutes aptères, il s'agit plutôt, dans le cas de plantes en provenance du Maroc, de *Spergularia purpurea* (PERS.) G. DON FIL., très courante au Maroc et que l'on peut considérer comme faisant partie de l'espèce linéenne, puisqu'il s'agit de *Spergularia rubra* (L.) DIETR. SUBSP. *longipes* (Lange) Briq.

Quoiqu'il en soit de l'exacte détermination de l'espèce de Spergularia fournie sous le nom d'*Arenaria rubra*, nous n'avons constaté aucune différence qualitative dans la composition en

* Des amis , pharmaciens au Maroc, ont ramassé pour nous dans la région de Chella (Rabat) de la Sabline rouge identifiée par un professeur de Botanique de la Faculté de Rabat comme étant *Spergularia rubra*. Cependant nous avons trouvé dans cet échantillon très homogène de nombreuses graines largement ailées.

polyphénols des drogues que nous avons analysées, mais seulement des différences quantitatives dans les proportions relatives des divers constituants flavoniques.

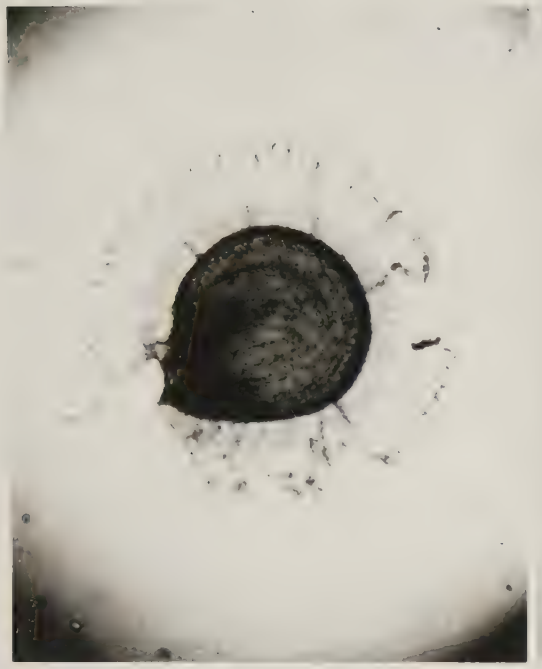


Fig. 11

Fig. 12

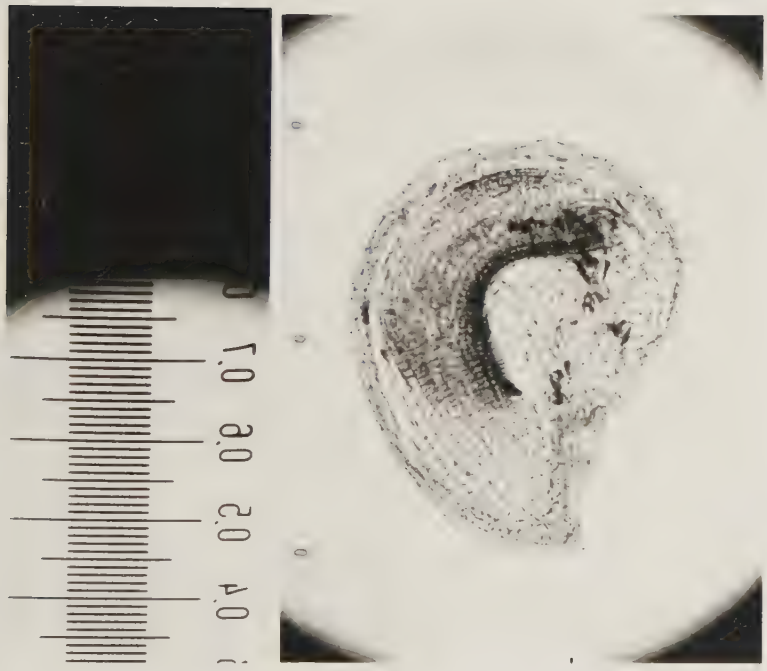


Fig. 13

Fig. 14

DEUXIEME PARTIE

ETUDE CHIMIQUE

TRAVAUX ANTERIEURS

Les phytothérapeutes modernes déplorent que la Sabline rouge n'ait pas encore été "scientifiquement analysée" (6). En réalité, certains travaux ont déjà été effectués à la fin du siècle dernier par le Dr JACQUEME de Marseille, puis par F. VIGIER, pharmacien à Paris, en 1879 (20) et en 1881 (38 bis)

Ces auteurs ont analysé et dosé les éléments minéraux solubles dans l'eau qui, d'après eux, sont responsables de l'action physiologique des préparations de Sabline rouge (infusion - décoction - extrait aqueux -). VIGIER parle également d'un "produit résineux à odeur de benjoin" extractible par l'éther ou l'alcool de titre élevé, qui participerait aussi à l'action physiologique.

A partir d'un extrait aqueux, VIGIER obtient aussi, par précipitation au moyen des sels de Plomb, deux séries de "produits organiques".

Avec l'acétate neutre de Plomb, le précipité est abondant et peu coloré.

Avec l'acétate basique de Plomb, le précipité est nettement coloré en jaune.

(38 bis) VIGIER (F.) VI Repert. Pharma. Paris, 1881, IX. cité par DECAUX (F.) " in diurétique..." (14)

En utilisant une méthode qui a servi jusqu'à ces dernières années pour séparer des monophénols les flavonoïdes à groupement orthodiphénoliques (GEISSMANN 1955), VIGIER a donc réussi à isoler, sans le savoir, les deux groupes de composés flavoniques présents chez *Sp. rubra*. Il constate également que les liqueurs très colorées obtenues après décomposition des précipités par l'hydrogène sulfuré, ne cristallisent pas dans les conditions habituelles.

Nous avons déjà dit que MALAPERT (23) avait reconnu que la Sabline rouge ne contenait pas de saponosides. Cependant DECAUX (14) contredit cette affirmation ; il s'appuie sur des travaux plus récents (39-40) mais effectués avec des méthodes physiologiques (pouvoir émétique chez le chien ; index hémolytique).

Nos recherches confirment l'avis de MALAPERT. Cette absence de saponosides peut étonner chez une Caryophyllacée. Signalons qu'une autre plante de cette famille, le mouron blanc, *Stellaria media* CYR., utilisée également en médecine populaire, ne contient pas non plus de saponosides (4).

(39) KALASMKOV et KUTZNETZOV - Farmasiya i Farmacol., 1937
(40) Max KOBERG. *Arenaria rubra*. Arch. Pharm., 275, 1937, articles cités par DECAUX "Un diurétique..." (14)

Nous n'avons pas trouvé d'autres études chimiques concernant des plantes du genre Spergularia, mises à part les analyses effectuées par PARIS et LYS (12) et par BOUCHE (41) sur les saponines de *Spergularia marginata* KITTEL.

D'ailleurs les principales études chimiques portant sur des Caryophyllacées concernent surtout les plantes contenant des saponosides, et susceptibles de servir de matières premières pour l'extraction de la saponine commerciale. Une revue des travaux concernant les saponosides triterpéniques des Caryophyllacées a été faite en 1964 par BOITEAU et RATSINAMANGA (9). Un article de BASU et RASTOGI (42) fait état de publications plus récentes. Actuellement les triterpénoïdes des Caryophyllacées sont particulièrement étudiés par les Russes. (Travaux de BUKHAROV, CHIRVA, KHORLIN, KOCHCTKOV, ODOVOV, ABULAKIROV...).

Quelques chimistes enfin se sont intéressés aux composés flavoniques des Caryophyllacées.

HORHAMMER (43) a identifié des flavonols dans les feuilles d'*Herniaria glabra* : deux glycosides de quercetol, et deux glycosides d'isorhamnetol.

Certaines espèces de Dianthus contiennent des flavonoïdes moins courants : *D. Knapii* contient un flavonoïde hexahydroxylé, la quercétagétine ; *D. variabilis*, deux chalcones (la trihydroxy-2'-4'-4 chalcone et la butéine) et une aurone,

(41) BOUCHE J. Pharm. Belg., 1955, 10, 169 cité par BOITEAU "les Triterpénoïdes" p. 805 (9)
(42) BASU (H.) et RASTOGI (R.P.). Phystochem. G.B. 1969, 6, n° 9, 1249-1270
(43) HORHAMMER (L.) WAGNER (H.) PROBST (W.) Naturwissenschaften (1960) 47, 63, cité par HARBORNE Comp. biochem. p.135 (28)

la sulfurétine (44).

Mais les travaux les plus anciens et les plus nombreux concernent les flavonoïdes de *Saponaria officinalis* L. à partir de laquelle BARGER (24) a isolé la saponarétine en 1906.

Par hydrolyse acide, la saponarine donne naissance à un mélange de vitexine, isolée précédemment par PERKIN (45) du bois de *Vitex lucens*, et de saponarétine reconnue identique par SEIKEL (46) puis par CAMBIE (47) à l'homovitexine ou isovitexine isolée aussi par PERKIN.

La molécule de ces composés contient encore un sucre non libéré par hydrolyse acide, car il est fortement attaché au squelette flavonique par une liaison Carbone-Carbone.

La structure exacte et les relations structurales de la vitexine et de l'isovitexine n'ont été démontrées que récemment par HOROWITZ et GENTILI (48) grâce à l'étude des spectres de R M N de ces deux C-glycoflavones.

A notre connaissance, aucun des flavonosides de *Saponaria officinalis*, ni aucun autre C.glycoflavonoïde, n'a été trouvé jusqu'à ces dernières années chez d'autres plantes de la famille des Caryophyllacées.

Mais en 1967, PLOUVIER (49) a isolé des tiges feuillées de *Silene Schafta* Gmel. petite Caryophyllacée ornementale originaire

(44) GOODWIN (T.W.) : Chem. Bioch. of plant pigm. 1965, p. 269
(45) PERKIN (G.) J. Chem. Soc., 1898, 73, 1019-1031
(46) SEIKEL (M.K.) et coll. Arch. Biochem. and Biophys., 1959, 85, 272-273
(47) CAMBIE (R.C.) : Chem. and. Indus., 1957, 17 janvier, 87-88
(48) HOROWITZ (R.M.), GENTILI (B.) : Chem. and. Indus., 1964, 21 mars, 498-499
(49) PLOUVIER (V.) : C.R. Acad. Sc. Paris , 1967, 265, 516-519, Série D.

de Perse, un di-C-glycoflavonoïde dont la structure n'est pas totalement élucidée et qu'il a baptisé schaftoside. Ce serait un di-C-glycoside d'apigénine ; et les deux sucres fixés sur le noyau seraient différents puisque le schaftoside s'isomérise par chauffage en milieu acide.*

Du même type est le glycoside A isolé par LITVINENKO (V.I.) et DARMOGRAI (V.N.) à partir de *Silene conica* L. (50).

La même équipe de chercheurs russes a étudié *Vaccaria segetalis* (=*Saponaria Vaccaria* L.) où il a identifié l'isosaponarine, O-glucoside en 4' de la saponarétine (51).

Les mêmes auteurs ont également trouvé des C-glycoflavonoïdes chez une autre Silénoïdée, dont ils ont étudié par ailleurs les composés triterpénoïdes, *Gypsophila paniculata* L. (52).

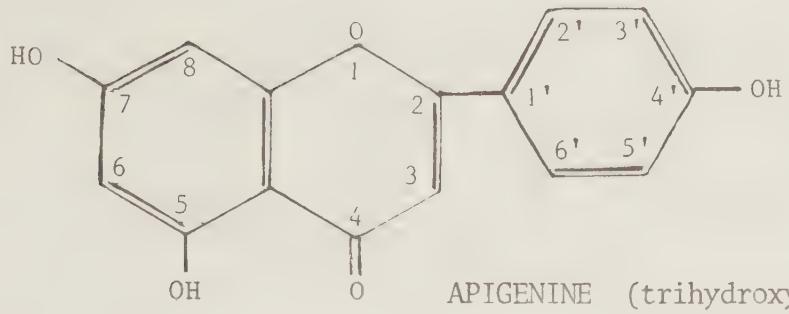
Chez cette Caryophyllacée sont présent des mono-C-glycosides, vitexine, saponarétine, orientine, homoorientine, ainsi que certains O-glycosides correspondants, isosaponarine et un nouveau composé le Katchimoside qui serait un O-xyloside de vitexine.

Malheureusement, les publications de ces chercheurs sont en russe, et, formules mises à part, nous n'avons pu prendre connaissance de ces très intéressants travaux que par les résumés in fine, reproduits d'ailleurs dans les "Chemical Abstracts".

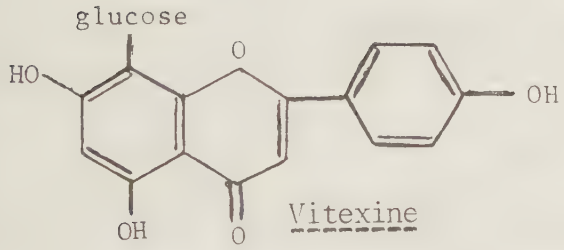
* Observations personnelles, grâce à un échantillon de Schaftoside fourni par M. PLOUVIER à M. le Professeur CHOPIN qui a eu la grande amabilité de nous en donner quelques mg.

(50) LITVINENKO (V.I.) et coll. Dopov. Akad. Nank Ukr. R S R série B, 1968, 30, n° 7, 639-642
(51) LITVINENKO (V.I.) et coll. Khim. Prirod. Soedim. Uzbek S S R., 1967, n° 3, 159-164
(52) DARMOGRAI (V.N.) et coll. Khim. prirod Soedim. Uzbek S S R., 1968, n° 4, 248-249

PRINCIPAUX C-GLYCOSIDES D'APIGENINE

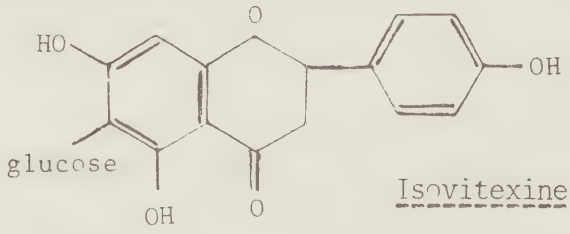


APIGENINE (trihydroxy-5,7,4' flavone)



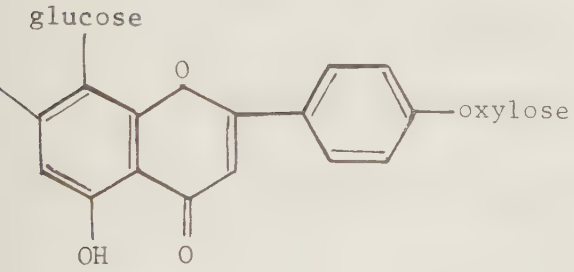
Vitexine

C-glucosyl-8 apigénine

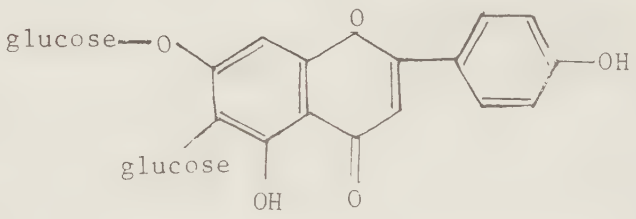


Isovitexine

C- glucosyl-6 apigénine
= saponarétine

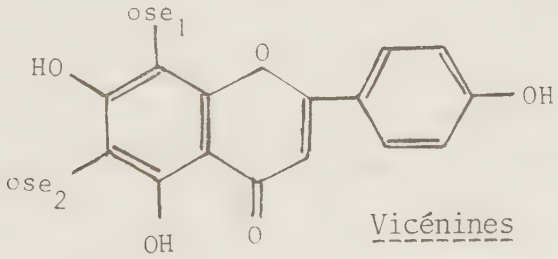


4'-O-xyloside de Vitexine



Saponarine

7-O-glucoside d'isovitexine



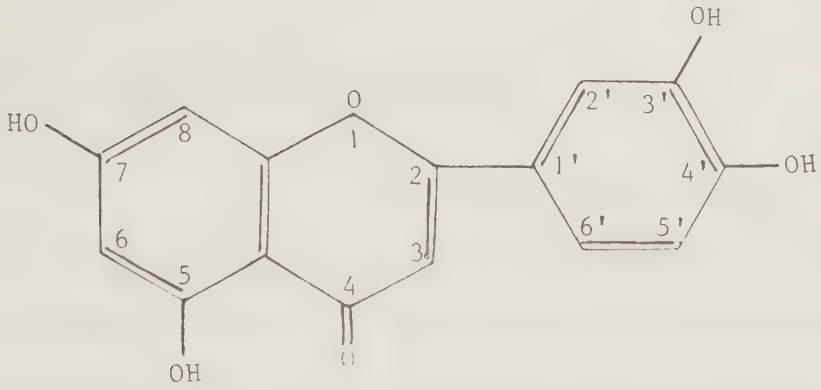
Vicénines

Di-C-glycosyl-6,8 apigénine

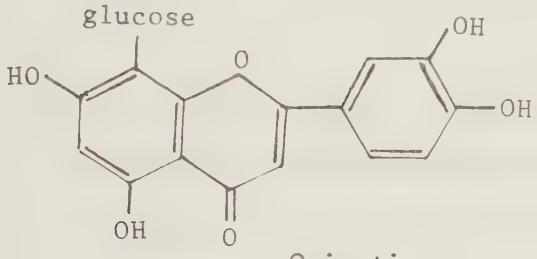
$ose_1 = ose_2$ Type Vicénines 2 de SEIKEL

$ose_1 \neq ose_2$ Type Vicénines 1 et 3 de SEIKEL.

PRINCIPAUX C-GLYCOSIDES DE LUTEOLINE

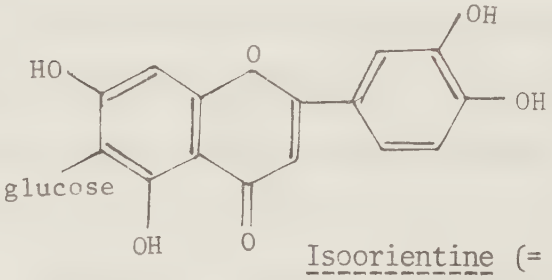


LUTEOLINE (tétrahydroxy-5,7,3',4' flavone)



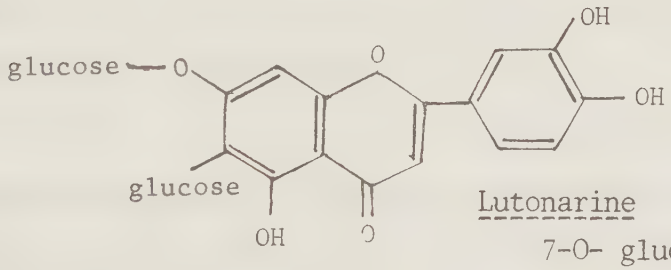
Orientine

C-glucosyl-8 lutéoline



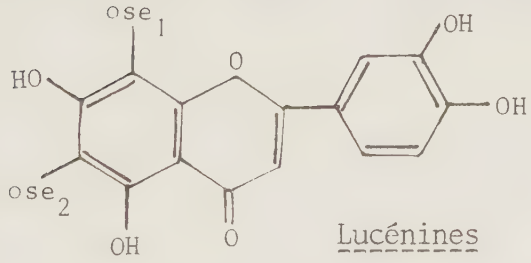
Isoorientine (= Homoorientine)
(= Lespecapitoside)

C-glucosyl-6 lutéoline



Lutonarine

7-O- glucoside d'isoorientine



Lucénines

Di-C-glycosyl-6,8 lutéoline

$ose_1 = ose_2$ Type Lucénines 2 de SEIKEL

$ose_1 \neq ose_2$ Type Lucénines 1 et 3 de SEIKEL.

TRAVAUX PERSONNELS

CHAPITRE I - CHOIX DU MATERIEL VEGETAL

L'état dans lequel la drogue nous a été fournie ne nous a pas permis d'étudier séparément feuilles, fleurs, tiges. D'ailleurs les feuilles et les fleurs sont de dimension si modeste que, même sur une plante fraîche, il serait très laborieux d'obtenir des quantités suffisantes de ces organes végétaux.

Les racines sont normalement absentes de nos échantillons puisqu'on utilise en herboristerie la plante entière feuillée coupée au ras du sol. Quelques rares spécimens possèdent encore leurs racines, ce qui permet une étude botanique.

Par contre, la plante rapportée du Maroc a été récoltée avec ses racines, et nous avons pu les examiner séparément (20 g au total).

L'ensemble de nos études chimiques ou pharmacodynamiques a donc porté sur la plante entière et ses constituants actifs, plante entière qui constitue la drogue utilisée en thérapeutique, ce qui justifie cette étude globale (53).

(53) PARIS (R.) MURGU (L.) Pl. Med. Phyt., 1970, 4, n° 2, 138-149

CHAPITRE II - ESSAIS D'ORIENTATION

Nous avons effectué, sur des liqueurs extractives de *Sp. rubra* obtenues dans diverses conditions, les réactions préliminaires habituellement réalisées sur une plante de composition inconnue.

1 - Recherche des alcaloïdes :

La présence d'alcaloïdes est signalée par HULTIN et TORSELL (54) dans plusieurs "Spergula" (*Spergula arvensis*, *Spergula marginata*, *Spergula rubra*) ; comme ces auteurs semblent confondre les genres Spergula et Spergularia, nous avons recherché avec un soin particulier les alcaloïdes chez notre *Spergularia rubra*.

Les réactions effectuées sur une teinture au 1/10e préparée dans l'alcool à 70°, évaporée à sec et reprise dans HCl N/10, ont été négatives avec les réactifs de MAYER, de BOUCHARDAT et de DRAGENDORF, ainsi qu'avec le réactif à l'iodo-platinate.

La technique préconisée par HULTIN et TORSELL ne nous a pas donné de meilleurs résultats.

(54)HULTIN (E.) et TORSELL (K.) Phytochemistry, 1965, 4, 425-433

2 - Recherche des quinones :

25 ml de teinture sont évaporés jusqu'à consistance d'extrait mou, puis repris par 5 ml HCl à 20 % chaud. On extrait la solution obtenue par un mélange éther-chloroforme (2 - 1). Sur la phase organique évaporée, on fait la réaction de BRISSEMORET et COMBE avec une solution d'acétate de nickel à 5 %.

La réaction est négative.

3 - Recherche des tanins :

Cette recherche est réalisée sur un décocté aqueux à 5 %.

a - tanins galliques : le décocté, additionné de quelques gouttes d'une solution alcoolique de $FeCl_3$ à 2 %, prend une coloration jaune marron.

La réaction est négative.

b - tanins catéchiques : le décocté additionné de Réactif de Stiasny (formol chlorhydrique) et mis 30 minutes au bain marie bouillant, devient orange avec formation d'un floculat brunâtre.

La réaction est positive.

4 - Recherche des saponosides :

L'indice de mousse est réalisé suivant la technique de la Pharmacopée française Edition 1965. Il est inférieur à 100. En opérant sur des liqueurs aqueuses concentrées nous

calculons qu'il est voisin de 7.

Nous avons effectué l'indice de mousse à partir de la poudre de racines de *Spergularia rubra* envoyée du Maroc (Chella), et nous avons obtenu les mêmes résultats qu'avec les tiges feuillées.

Absence de saponosides

5 - Recherche des triterpènes et des stéroïdes :

Elle est effectuée sur la teinture évaporée à sec, et additionnée d'anhydride acétique puis d'acide sulfurique concentré (réaction de Liebermann).

Il se développe une coloration vert sale.

Réaction positive

6 - Recherche de composés à fonction lactonique :

Une teinture au 1/5e dans l'alcool à 70°, évaporée, reprise dans l'eau, filtrée, est extraite par du chloroforme. Celui-ci, séché sur $Na_2 SO_4$ anhydride, est évaporé, et le résidu repris par de l'alcool.

Cette solution sert à une caractérisation :

a - par le réactif de BALJET (acide picrique dans l'alcool), il se développe après addition de NaOH, une coloration orange. (réaction positive).

b - par le réactif de MOREL-MARTHOUD, (au méta dinitro-benzène,) on obtient une coloration violacée après addition de NaOH. (réaction positive).

c - par le réactif de KEDDE (acide dinitro-3-5-benzoïque dans l'alcool) après addition de NaOH la liqueur prend une coloration rouge violacé. (réaction positive).

Présence de corps à fonction lactonique.

7 - Recherche des sucres réducteurs :

Après défécation du décocté à l'acétate de plomb, le filtrat réduit la liqueur de FEHLING.

La réaction est positive.

Mais la réaction au xanthydrol pour la recherche des désoxysucres, est négative.

8 - Recherche des anthocyanes :

Une petite quantité de poudre de *Spergularia rubra* est mise à macérer dans du méthanol contenant 1 % d'acide chlorhydrique. Le liquide surnageant est nettement rose.

La réaction est positive.

D'ailleurs on distingue parfaitement dans la drogue, lors de la recherche et de l'examen des graines de *Sp. rubra* avec une loupe à fort grossissement, des pétales ayant gardé leur couleur rose.

9 - Recherche des composés flavoniques :

a - La teinture, additionnée d'alcool pour diminuer l'intensité de la teinte de fond, est additionnée d'HCl concentré ;

puis on ajoute du zinc ou du magnésium en tournure. Il se développe une coloration jaune orangé.

La réaction est positive - Type flavone

b - La teinture évaporée, reprise par l'eau, extraite au butanol, donne par addition de réactif au chlorure d'aluminium, une solution colorée en jaune qui présente une très nette fluorescence jaune en U. V.

La réaction est positive.

Présence de composés flavoniques.

Enfin nous avons terminé ces essais préliminaires par :

Le dosage de l'eau dans la drogue,

par entrainement azéotropique (méthode au xylène de la Pharmacopée française Ed. 1965, p. 1543), et au moyen de la balance à humidité Cenco.

Les résultats obtenus varient entre 6,8 et 7,4 %. En moyenne 7 %.

CHAPITRE III - CENDRES ET DOSAGE DES ELEMENTS MINERAUX

Au cours de nos travaux, chaque fois que nous avons repris dans l'alcool concentré le résidu d'évaporation d'une solution extractive aqueuse ou hydro-alcoolique de *Sp. rubra*, nous avons constaté qu'il restait un dépôt salin important. Cette observation nous a conduit à reprendre les analyses des premiers auteurs (JACQUEME - VIGIER - BERTHERAND) qui comparent la "tisane d'Arenaria à une véritable eau minérale chloro-carbonatée assimilable à celles de Bourbon-l'Archambault, de Niederbroon...etc."

Nous avons effectué le dosage des cendres totales après calcination au four à moufle sans dépasser 600°. Les résultats obtenus varient peu d'un lot à l'autre ; le taux de cendre est compris entre 8,5 et 9,5 % rapporté à la drogue sèche. Ce taux de cendres est donc intermédiaire entre celui de certaines drogues diurétiques comme le maïs (4 à 5 %) ou le chiendent (2 à 4 %), et celui d'autres drogues comme la prêle (15 à 18 %) ou les fleurs de bourrache (15 à 17 %).

Pour suivre VIGIER et JACQUEME, nous avons également dosé les cendres totales obtenues par calcination de l'extrait sec préparé par lixiviation de la plante à l'eau chaude (80° environ) ; nous avons recherché et dosé les principaux éléments minéraux auxquels on pourrait rapporter l'action diurétique de la drogue.

Les résultats sont les suivants :

Extrait aqueux sec obtenu à partir de 100 g de plante sèche	21,5 - 22,5 g
Cendres fournies par calcination de l'extrait sec au four à moufle à température inférieure à 800°	7,6 - 8,7 g
Sels solubles dans l'eau contenus dans ces cendres	5,4 - 6,8 g

Recherche et dosage des éléments minéraux présents dans les cendres obtenues par calcination de l'extrait sec.

		quantité en mg/g cendres
Cl^-	(méthode de MOHR.)	229 mg
$SO_4^=$	(Dosage néphélométrique par méthode THOMAS et COTTON)	20,3 mg
Na^+	(Photométrie de flamme)	197 mg
K^+	(Photométrie de flamme)	76 mg
Ca^{++}	(Complexométrie par méthode GAUTIER et PIGNARD)	4 mg
NO_3^-	(Colorimétrie par la réaction de CARON et RAQUET)	néant
Alcalinité (exprimée en $H_2 SO_4$ N)		5 ml

Nous trouvons moins de potassium que les premiers auteurs, mais, comme eux, nous constatons la richesse en sodium et en chlorure, une importante alcalinité ,et une absence de nitrates qui peut sembler étonnante si l'on veut expliquer l'action physiologique de la drogue par les seuls éléments minéraux.

CHAPITRE IV - ESSAIS DE SEPARATION DES TRITERPENES.

L'indice de mousse très faible de la drogue, alors que l'on obtient des réactions positives sur la teinture avec les réactifs des triterpènes d'une part, et les réactifs des lactones d'autre part, peut laisser supposer qu'il existe chez *Sp. rubra* des triterpénoïdes libres du type gypsogénine ou gypsogénine-lactone. Mais ces composés,présents chez la plupart des Caryophyllacées,se trouvent habituellement sous forme hétérosidique.

Nous avons effectué la recherche des composés triterpéniques sur l'insaponifiable obtenu à partir du résidu fixe laissé par évaporation du solvant ayant servi à dégraisser la plante avant l'extraction des flavonoïdes.

Le résidu fixe, produit cireux, résineux, vert foncé noirâtre, est saponifié par la méthode de la Pharmacopée française - Ed. 1965, p. 1561 :

5 g de résidu fixe donnent 1 g à 1,20 g d'insaponifiable.

Une partie de l'insaponifiable dissous dans l'éther de pétrole est passé sur colonne d'alumine neutre Merck d'activité 1, préparée dans l'éther de pétrole. On élue successivement par l'éther de pétrole, le benzène, l'éther éthylique, le chloroforme, le méthanol absolu, le méthanol aqueux. Des mélanges en proportions 90/10 ; 50/50 ; 10/90 sont utilisés comme transition entre deux solvants successifs.

On pratique les réactions de LIEBERMANN et de KEDDE sur les éluats évaporés et repris,soit dans le chloroforme, soit dans un mélange alcool-chloroforme.

On suit la marche des élutions par chromatographie sur plaque de gel de silice G.Merck avec des solvants de migration

différents selon les fractions analysées. On utilise comme révélateurs l'acide sulfurique au demi, le thrichlorure d'antimoine en solution chloroformique ou la vanilline sulfurique.

Le manque total de témoin nous a conduit à essayer de préparer de la gypsogénine à partir des racines de *Saponaria officinalis* en utilisant la méthode de KON et SOPER résumée par STEINER et HOLTZEM (55)

La poudre de racine de saponaire est extraite au méthanol absolu, à reflux. La liqueur obtenue après filtration, laisse déposer après 24 heures au réfrigérateur un précipité de saporubine-brute que l'on hydrolyse dans des conditions assez drastiques (7 heures à reflux avec HCl au demi). Le dépôt noirâtre obtenu par hydrolyse est lavé à l'eau, dissous dans l'éther, purifié sous forme de sel de potassium qui précipite. Ce sel de gypsogénine est lavé à l'éther, décomposé par addition d'acide, et on obtient de la gypsogénine purifiée soluble dans l'éther.

Cette gypsogénine assez fortement colorée n'est pas homogène en chromatographie ; elle donne une coloration violacée avec le réactif de LIEBERMANN.

La réaction de KEDDE est négative, ce qui semblerait prouver l'absence de gypsogénine-lactone, malgré la facile transformation de la gypsogénine en gypsogénine-lactone par chauffage en milieu acide (56)

(55) STEINER (M.), HOLTZEM (H.), in PAECH (K.), TRACEY (M.V.) : moderne methoden der Pflanzenanalyse, Bd III p. 115.

(56) KHORLIN (A. Y.) et coll : Isvest. Akad. Nauk S.S.S.R. 1963, 1398, 2008.

RESULTATS EXPERIMENTAUX :

1°/ Fractions obtenues par élution à l'éther de pétrole seul :

- Réaction de LIEBERMANN : négative
- Réaction de KEDDE : négative
- Chromatographies sur couche mince de gel de silice G. Merck

1 - solvant de migration : n hexane 40 - éther éthylique 60.

Il apparaît plusieurs taches. La tache supérieure de Rf ≠ 0,85, de coloration rose-brun avec la vanilline sulfurique, pourrait correspondre à un hydrocarbure terpénique neutre de type squalène ou β amyrène. Ceci semble confirmé en utilisant comme

2 - solvant de migration : le n hexane seul.

En effet, dans ces conditions, seuls migrent les hydrocarbures triterpéniques non polaires. (57a).

Nous obtenons, au voisinage du front, une tache de couleur rose-brunâtre avec la vanilline sulfurique (58).

2°/ Fractions obtenues par élution avec des mélanges ether de pétrole-benzène, puis par le benzène seul :

- Réaction de LIEBERMANN : négative
- Réaction de KEDDE : négative

(57a) STAHL (E.). Thin Layer chromatography. 1969, p. 241.
d'après KAUFMANN (H.P.). Fette, Seifen, Anstrichmittel, 1964, 66, p. 461.

(58) ATTAWAY (J.A.) et coll., Analytical Chemistry, 1965, 37, p. 1289-1290.

3°/ Fractions obtenues par élution avec des mélanges Benzène/éther éthylique ; éther éthylique seul ; éther éthylique/chloroforme ; chloroforme seul.

- Réaction de LIEBERMANN : positive, coloration verte, avec le maximum intensité pour les fractions obtenues par le mélange Benzène/éther éthylique, 50/50.
- Réaction de KEDDE : négative.
- Chromatographie sur couche mince de gel de silice G. Merck.
  - . Solvant de migration : Ether 80 - Benzène 20. (40).
  - . Témoin : Gypsogénine (?) extraite de la racine de Saponaria officinalis.
  - . Révélateur : Trichlorure d'antimoine - puis chauffage.

Pour le témoin, après pulvérisation par le trichlorure d'antimcine puis chauffage, apparaissent des taches rose mauve :

Une tache nette de Rf 0,20 (STAHL, d'après KHORLIN, indique Rf 0,25 pour la gypsogénine.). (57b)

Trois taches successives dont le Rf est compris entre 0,61 et 0,84. La plus importante de ces taches, de couleur rose mauve semblable à celle de la tache inférieure, a un Rf = 0,63.

Les fractions analysées montrent deux taches de même couleur que les taches témoins, et dont les Rf sont 0,19 et 0,23. Pas de tache au niveau des taches supérieures du témoin.

(57b)STAHL (E.) ouvrage cité p. 243.

4°/ Fractions obtenues par élution avec un mélange benzène 90 - méthanol 10.

- Réaction de LIEBERMANN : positive ; couleur verte devenant violacée.
- Réaction de KEDDE : positive. On obtient une coloration (ou même un précipité) rouge pourpre violacé, comparable à celle d'un témoin d'ouabaïne.

Ces fractions semblent donc renfermer un dérivé du type gypsogénine-lactone.

- Chromatographie dans les mêmes conditions que pour les fractions précédentes et toujours en présence d'un témoin de "gypsogénine".

Les éluats ne donnent qu'une seule tache, de coloration rose mauve, semblable aux colorations déjà obtenues, et de Rf = 0,82 correspondant à la tache supérieure du témoin chez qui elle est très peu apparente. (STAHL (57b), d'après KHORLIN indique un Rf = 0,85 pour la gypsogénine-lactone).

5°/ Les fractions obtenues par élution avec un mélange benzène 50 - méthanol 50 et par des solvants plus polaires, ne donnent plus de réactions de LIEBERMANN ou de KEDDE positives.

Conclusion :

Ces essais demandent à être repris lorsque nous disposerons de témoins sûrs.

CHAPITRE V

ETUDE DES FLAVONOIDES ET DE QUELQUES AUTRES POLYPHENOLS

A - PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL :

Elimination des graisses et de la chlorophylle. p. 41

B - ISOLEMENT DES FLAVONOIDES :

1°- EXPOSE DES METHODES D'ANALYSE UTILISEES POUR LA SURVEILLANCE DES EXTRACTIONS ET DES FRACTIONNEMENTS :

1- Chromatographie sur C. M. de polyamide. p. 44
2- Dosage des flavonoïdes par spectrophotométrie en U. V. p. 47

2°- EXTRACTION DES FLAVONOIDES A PARTIR DE LA PLANTE :

1- Essais préliminaires : recherche des meilleurs solvants. p. 52
2- Etude des méthodes d'extraction. Choix d'un solvant.
a- Extraction par macération au moyen de l'eau et des alcools éthylique ou méthylique dilués. p. 53
b- Extraction par lixiviation au moyen de l'eau et des alcools méthylique ou éthylique dilués. p. 55

3°- FRACTIONNEMENT DES FLAVONOIDES ET ISOLEMENT DES ACIDES ORGANIQUES A PARTIR DU LIXIVIAT

1- Fractionnement par solvants non miscibles. p. 60
2- Séparation des divers flavonoïdes par chromatographie. p. 65

a- Aglucones

- Méthodes analytiques employées pour surveiller l'extraction et le fractionnement. p. 66
Chromatographie bidimensionnelle
- Méthode d'isolement. p. 68
Chromatographie sur plaque gel silice, sur papier W_1

b- Hétérosides . p. 70
- Chromatographie sur colonne de polyamide . p. 74
- Chromatographie sur papier . p. 76

C - PURIFICATION ET ESSAIS D'IDENTIFICATION DES FLAVONOIDES ISOLES

A- AGLUCONES . p. 81

B- HETEROSIDES . p. 86

I) METHODES GENERALES DE PURIFICATION

1- Chromatographie descendante sur papier W_{20} ou W_1 avec l'acide acétique dilué . p. 86

2- Chromatographie descendante sur W_1 avec le solvant de Partridge . p. 87

3- Chromatographie sur couche mince de gel de silice . p. 88

II) METHODES DE CONTROLE DE LA PURETE DES FLAVONOSIDES ISOLES

1- Chromatographie bidimensionnelle sur papier . p. 91

2- Chromatographie bidimensionnelle sur plaque de polyamide. p. 92

III) METHODES D'ETUDE DES FLAVONOSIDES PURIFIES

Hydrolyse alcaline - Hydrolyse acide . p. 93

1- Chromatographies comparatives des flavonosides entre eux et avec des témoins. p. 94

2- Utilisation de réactifs spécifiques pour la révélation des chromatogrammes. p. 94

3- Examen des spectres U. V. avant et après hydrolyse. p. 95

4- Autres méthodes spectrales. p. 95

IV) METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE DES OSES. p. 96

V) ETUDE DES DIVERS COMPOSES FLAVONIQUES

voir plan détaillé page 98

- Examen rapide des flavonosides de la plante fraîche. p. 150

CHAPITRE V : ETUDES DES FLAVONOSIDES ET DE QUELQUES AUTRES POLYPHENOLS

A - PREPARATION DU MATERIEL VEGETAL : Elimination des graisses et de la chlorophylle.

Bien que la drogue sèche contienne environ 7 % d'eau, nous ne la desséchons pas à l'étuve avant dégraissage par crainte d'altérer les flavonosides, mais, pour ne pas dissoudre ces composés nous utilisons des solvants anhydres, éther de pétrole ou chloroforme fraichement distillé sur chlorure de calcium. (59).

Les chromatographies que nous avons faites sur les liqueurs de dégraissage de 200 g de plante concentrées au volume minimum, ont confirmé que les flavonoïdes présents chez *Spergularia rubra* n'étaient pas extraits dans ces conditions.

Le meilleur dégraissage est obtenu après avoir fait macérer la drogue, réduite en poudre demi fine et disposée en couche assez mince (3 à 5 cm max.), dans une quantité de solvant suffisante pour que le volume du surnageant soit au moins égal au volume de la plante imbibée. Après 8 à 12 heures, on décante puis on effectue une percolation avec du solvant frais. On poursuit la percolation jusqu'à ce que le lixiviat s'écoule clair et incolore, et ne laisse pratiquement plus de résidu par évaporation. Il faut lixivier avec une quantité de solvant égale à 12 - 15 fois celle du poids de la plante.

L'éther de pétrole et le chloroforme donnent des résultats très comparables.

(59)LEBRETON (Ph.) et coll. Chim. Anal., 1967, 49, n° 7, 375 - 383.

L'éther de pétrole passé sur une plante convenablement traitée au chloroforme, n'extrait plus rien. Il en est de même pour le chloroforme passé sur une plante préalablement traitée à l'éther de pétrole.

Ce traitement est cependant très insuffisant pour se débarrasser de la chlorophylle. Celle-ci reste encore en quantité importante dans la plante, et passe ensuite dans les liqueurs d'extraction des polyphénols, puis dans les phases éthérées obtenues à partir de celles-ci, et sa présence est très gênante. Nous n'avons pas réussi à mieux éliminer la chlorophylle en traitant à l'éther de pétrole les liqueurs aqueuses d'extraction obtenues, soit directement à partir de la plante, soit à partir de la plante dégraissée.

Aucune amélioration n'a été constatée non plus en pratiquant le dégraissage au Soxhlet.

Pour un même échantillon de plante, le poids de résidu fixe fourni par extraction au Soxhlet ou par macération puis lixiviation est identique. Par contre les plantes de provenances différentes donnent parfois des résultats un peu divergents ; la teneur en chlorophylle varie aussi : certains résidus sont bruns, d'autres nettement verts.

Enfin le poids du résidu obtenu par évaporation spontanée à froid est un peu supérieur à celui obtenu par évaporation au "Rotavapor". La plante contient en effet des "principes aromatiques" (Vigier) qui doivent être entraînés dans ces conditions.

T A B L E A U I : Résidu fixe

rapporté à 100 g de plante contenant 7 % d'eau

Provenance de la drogue	Macération puis lixiviation			Soxhlet	
	Ether de pétrole		Chloroforme	Ether de pétrole	
	Evaporation Rotavapor	Evaporation à froid	Evaporation à froid	Evaporation Rotavapor	Evaporation à froid
Lot n° 1	1,60 g 1,55 g	2,80 g	2,90 g	2,49 g	2,08 g
Lot n° 2	4,49 g	5,50 g	5,00 g	5,20 g	5,00 g
Lot n° 3		2,40 g	2,35 g		

B - ISOLEMENT DES FLAVONOIDES

1° - EXPOSE DES METHODES D'ANALYSE UTILISEES POUR LA SURVEILLANCE DES EXTRACTIONS ET DES FRACTIONNEMENTS.

1 - CHROMATOGRAPHIE

Une étude des méthodes analytiques concernant les composés flavoniques a été faite, entre autres, par EGGER (60). Il expose une méthode de chromatographie sur couche mince qu'il a mise au point en s'inspirant des travaux de l'école de HORHAMMER (61). EGGER utilise, comme adsorbant, de la poudre de polyamide contenant 20 % de cellulose, et comme solvant un mélange : eau, éthanol, méthyl-éthylcétone, acétyl acétone, (13-3-3-1 en vol.) (61). EGGER a utilisé en particulier cette méthode pour une étude systématique de plantes de la famille des Renonculacées (62) (63). Dans ces plantes il s'agit de flavonols : néanmoins la méthode de EGGER a une portée plus générale et permet de séparer en divers groupes les flavonosides d'un mélange, à la condition toutefois que les aglucones de base appartiennent à la même série.

Dans ce cas, la nature des divers aglucones n'a que très peu d'influence. Le nombre des hydroxyles phénoliques libres ne joue que dans la mesure où ils sont "isolés" ; c'est ainsi que deux hydroxyles en ortho, n'ont pas plus d'action qu'un seul hydroxyle. Par contre le nombre et l'emplacement des sucres jouent un rôle essentiel. La nature hexose ou pentose du sucre entre aussi en ligne de compte (60).

(60) EGGER (K.) Planta medica, 1964, 3, p. 271
(61) EGGER (K.), KEIL (M.) Z. Anal. chem., 1965, 210, n°3, 201-209
(62) EGGER (K.), KEIL (M.) Sond. Bericht. Deutsch. Bot. Gesell., 1965, 78, n°9, p. 418-422
(63) EGGER (K.), KEIL (M.) même revue, 1965, 78, p. 153-155

Avec cette méthode on peut séparer en groupes les glycosides d'une même famille d'aglucones. Les aglucones eux-mêmes restent sur la ligne de départ. Les glucuronides et les paracoumaroylglucosides se déplacent à peine (= zone I). On trouve ensuite les monosides ; les glucosides migrant un peu plus haut que les rhamnosides (= zone II) Rf : 0,15 à o,25.

Puis vient l'ensemble des corps diglycosylés sur le même carbone : 3 ou 7-rhamnoglucosides , 3 ou 7-diglucosides, 3 ou 7-xyloglucosides. (= zone III). Rf : 0,35) 0,45. Un intervalle très net sépare ces composés des glycosides disubstitués sur deux carbones différents. Ceux-ci sont suivis de très près par les hétérosides trisubstitués : deux sucres sur un carbone, un sucre sur un autre carbone ; ou trois sucres sur des carbones différents. (= zone IV) Rf : 0,60 à 0,85. Figure : 15.

Mais, à l'intérieur de chaque groupe il n'y a pas de "séparations fines" possibles (60).

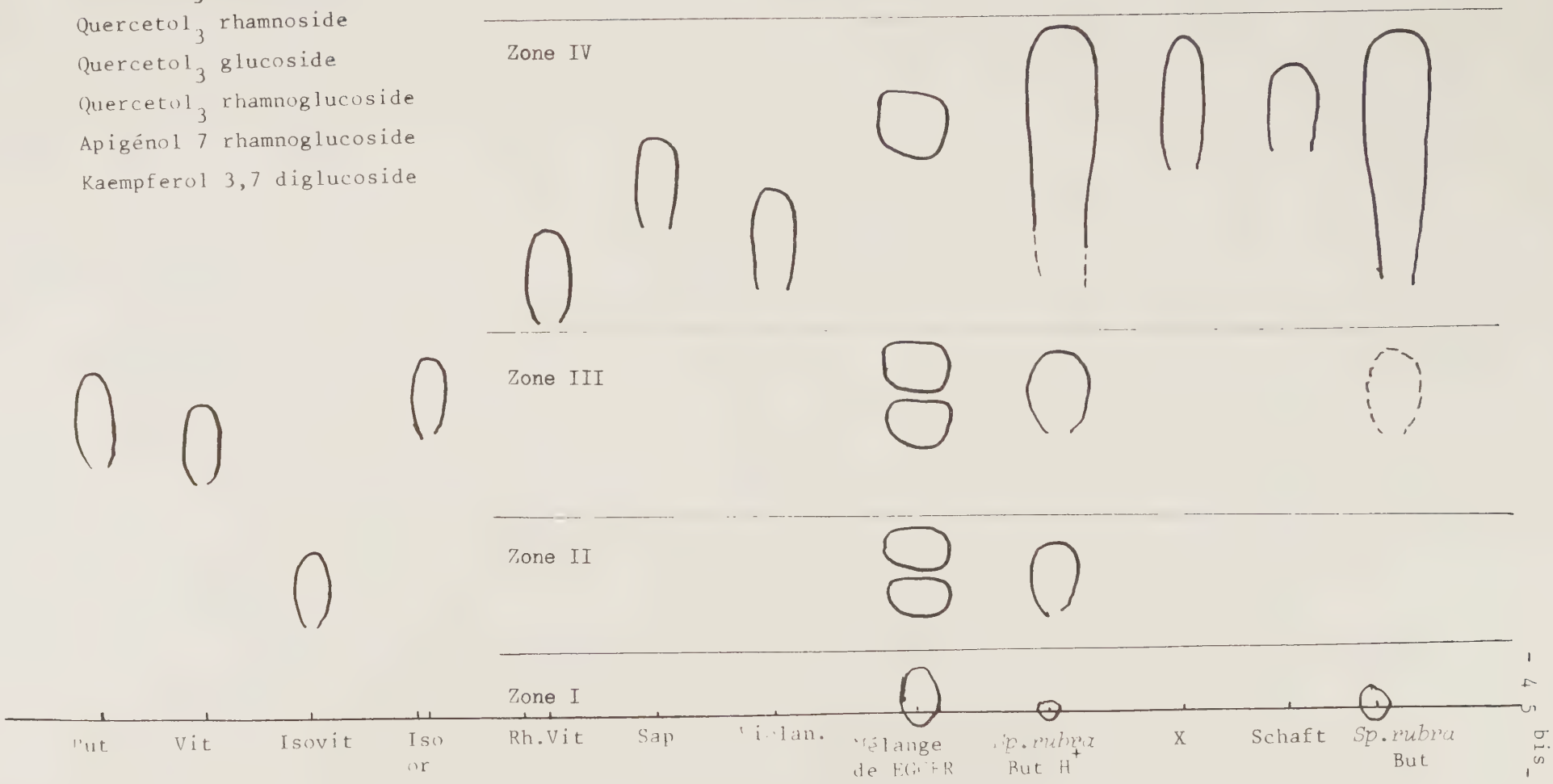
Pour l'étude de *Spergularia rubra* qui contient essentiellement des di- et des triglycosides de flavones (appartenant de plus au groupe des C-glycoflavones), nous avons dû modifier légèrement la méthode de EGGER afin d'obtenir une migration de la zone IV convenable et sans trainées.

Une légère augmentation de la quantité d'éthanol, avec diminution correspondante de la quantité d'eau, empêche les trainées ; mais une trop forte augmentation amène une diminution des distances entre les diverses zones de glycosides.

Fig. 15 CCM = Polyamide
Solvant = 12/4/3/1
Révélation = $AlCl_3$

Mélange de EGGER :

- $Quercetol_3$ glycuronide
- $Quercetol_3$ rhamnoside
- $Quercetol_3$ glucoside
- $Quercetol_3$ rhamnoglucoside
- Apigénol 7 rhamnoglucoside
- Kaempferol 3,7 diglucoside



Nous obtenons de bons résultats avec les proportions suivantes : eau=12 ; éthanol=4 ; méthyl-éthylcétone=3 ; acétyl-acétone=1 (solvant : 12/4/3/1), à condition de laisser migrer jusqu'à 13 ou 14 cm.

Pour l'adsorbant, nous préférons utiliser la poudre de polyamide Merck 11 ou Machery-Nagel D.C. 11, sans adjonction de poudre de cellulose (23 g de poudre dans 70 ml de méthanol pour 5 plaques 200 x 200). L'adhérence au verre est bonne si on laisse sécher à l'air suffisamment longtemps (au moins 24 heures).

La migration dans des cuves chemisées ou dans des chambres de volume très réduit (chambre de développement S ; Desaga) n'apporte pas d'autre amélioration que l'augmentation de la vitesse de développement.

Les séparations que l'on obtient parfois à l'intérieur de chaque zone (zone IV en particulier), si l'on chromatographie d'assez faibles quantités de substances, sont illusoires. Les analyses ultérieures montrent qu'il s'agit plutôt d'un enrichissement en l'un des constituants du mélange.

D'autre part, la nature des adsorbants commerciaux que nous avons pu nous procurer, interdit d'utiliser cette technique en chromatographie préparative. Les isolements que nous avons réalisés ainsi nous ont conduit à de graves déboires : nos produits finaux, malgré toutes les tentatives de purifications ultérieures, contenaient encore une forte proportion du "liant" présent dans les adsorbants Merck ou Machery-Nagel, et ne permettaient aucune étude des flavonosides par spectrographie de masse, I. R. ou R. M. N. Les spectres U. V. eux-mêmes étaient perturbés.

Néanmoins la chromatographie sur couche mince de polyamide avec le solvant modifié de EGGER, est une bonne méthode, assez rapide (migration environ 2 heures) avec laquelle on peut suivre la marche d'un extraction, d'un fractionnement à ses premiers stades. Elle donne des indications précieuses sur la nature des flavonosides d'une plante, et permet de constater leur modification après une hydrolyse.

La nature de l'adsorbant interdit cependant d'utiliser comme révélateurs des réactifs à base d'eau.

Les résultats sont bons en utilisant les chlorures d'aluminium ou de zirconium. Mais on est privé de certaines indications (détection des dérivés ortho-dihydroxylés) fournies par des révélateurs comme le réactif de Benedikt ou le réactif à l'acétate basique de plomb très utilisé par l'école de WAGNER et HORHAMMER.

2° - DOSAGE DES FLAVONOIDES PAR SPECTROPHOTOMETRIE EN U.V.

Il s'agit d'un dosage inspiré de la méthode de LEBRETON (59) et fondé sur l'action spécifique du chlorure d'aluminium comme agent chélatant.

En effet, même au niveau de la bande I des flavonoïdes (304 - 350 nm) la spectrophotométrie dans l'U. V. est sujette, surtout pour les flavones, à de nombreuses interférences que l'on peut éliminer en grande partie par l'action du chlorure d'aluminium.

La hauteur du pic différentiel ($D.O._{Al^{3+}} - D.O._{CH_3OH}$) observée au maximum d'absorption (390 nm pour les flavones) est proportionnelle à la teneur en aglucone des flavonoïdes. Dans le cas d'un mélange, la hauteur des pics spectraux est additive. La reproductibilité de la méthode est de plus ou moins 10 à 12 % selon LEBRETON, (et selon nos propres observations), et la sensibilité est d'environ 10 ppm.

Nous calculons la teneur en flavonoïdes en nous reportant à une courbe étalon, établie dans les mêmes conditions avec un aglucone de référence choisi plus ou moins arbitrairement, mais faisant partie du même groupe de flavonoïdes que l'ensemble des composés présents dans le mélange à doser. Pour déterminer ce groupe, on fait le spectre du mélange dans le méthanol seul, (λ max. = ca 340 nm pour nos solutions extractives), puis le spectre différentiel en présence de chlorure d'aluminium (max = ca 392 nm pour nos solutions). La longueur d'onde observée au maximum d'absorption en présence de chlorure d'aluminium, indique s'il s'agit de flavonols (λ max = ca 435 nm) ou de flavones (λ max = 385 à 400 nm) ce qui est notre cas.

Nous avons établi une gamme étalon d'apigénine au pic différentiel maximum (390 nm) et noux exprimons les résultats de nos dosages en cet aglucone. (fig. 16 : courbe étalon).

Cette méthode nous donne les mêmes résultats que celle de LEBRETON qui utilise une formule où intervient l'absorption molaire au pic différentiel. (Tableau II).

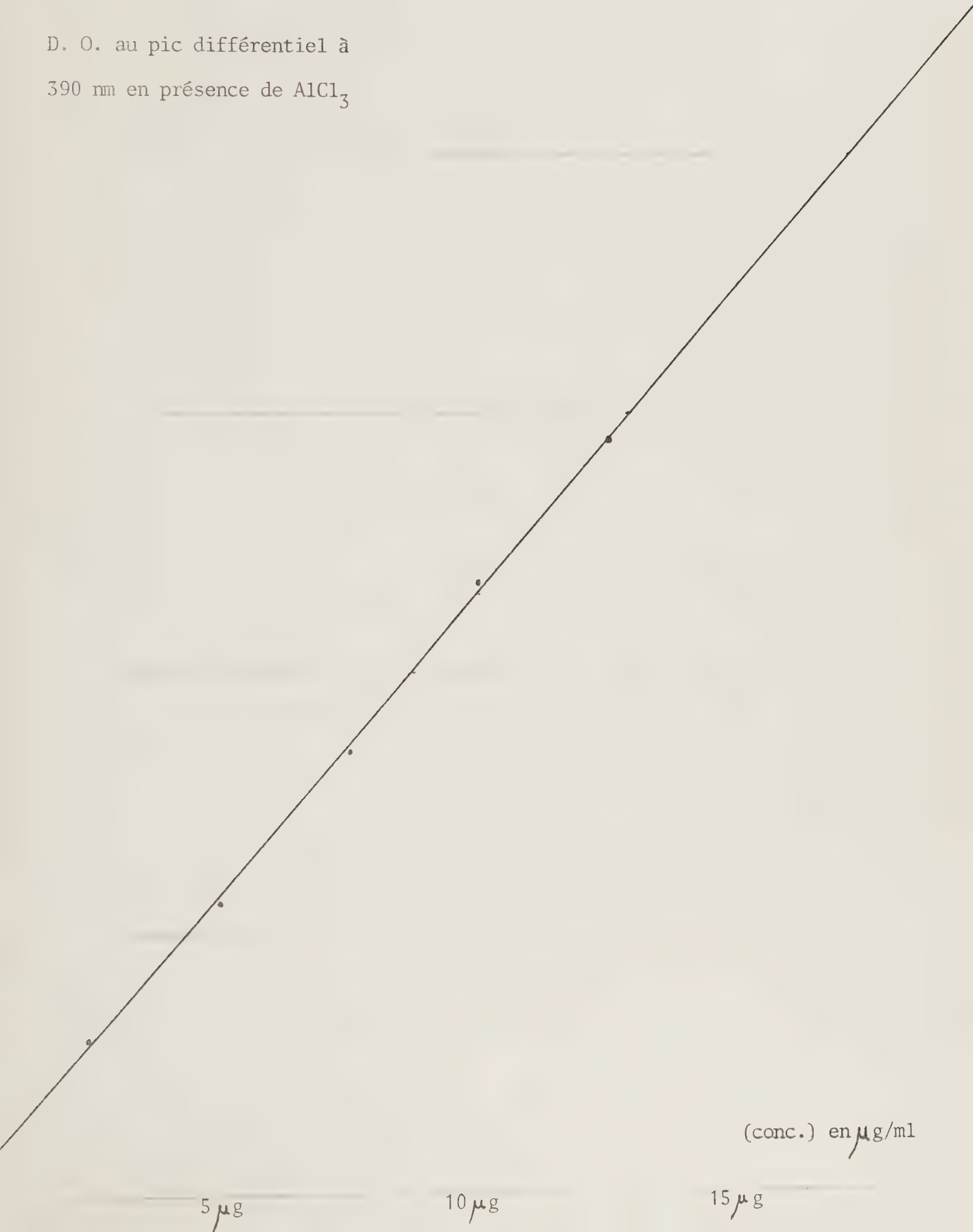
Fig. 16

Gamme Etalon

d' A P I G E N I N E

D. O. au pic différentiel à

390 nm en présence de $AlCl_3$



T A B L E A U II : Quantité de flavonoïdes en mg/g plante (exprimée en apigénine)

	E_1	E_2	E_3	E_4
Calculs par la formule de LEBRETON	1,16mg	1,12mg	1,22mg	1,10mg
Lecture sur la courbe étalon	1,17mg	1,11mg	1,25mg	1,10mg

Les difficultés que nous rencontrons viennent du fait que les flavonoïdes présents chez *Spergularia rubra* sont des hétérosides résistant à l'hydrolyse, et ne fournissant pas d'aglucones que l'on peut facilement extraire du mélange par l'éther et purifier.

Néanmoins, même sur des solutions extractives brutes, très colorées par des produits non flavoniques, le dosage est réalisable avec des résultats reproductibles si la concentration en flavones est suffisante pour que l'on puisse diluer jusqu'à ce que le liquide, peu coloré, contienne encore 10 µg/ml environ de flavonoïdes (exprimés en aglucone). Dans ces conditions, la densité optique est

effectivement proportionnelle à la concentration.

Il faut respecter aussi quelques conditions opératoires. Pour diluer les solutions extractives qui contiennent toujours de l'eau si on veut que tout soit dissous dans un faible volume, il faut utiliser du méthanol. En effet, avec cet alcool, (MABRY), les complexes aluminiques ne sont pratiquement pas dissociés en présence de quantités d'eau relativement importantes (30 %). Par contre un très faible pourcentage d'eau (1 à 5 %) peut détruire à 90 % les complexes aluminiques des flavonoïdes en solution dans l'éthanol.

Il faut également veiller à ne pas être en milieu acide pour réaliser les dosages afin de ne pas détruire les complexes aluminiques formés avec les flavonoïdes orthodihydroxylés.

Enfin, il faut attendre au moins une demi-heure après l'addition du chlorure d'aluminium pour effectuer la lecture de la densité optique : la chélation avec l'aluminium semble se réaliser beaucoup plus lentement lorsque l'on est en milieu complexe.

Cette méthode de dosage nous a donné satisfaction pour déterminer la valeur d'une méthode d'extraction en évaluant globalement les flavonoïdes. Nous l'avons utilisée aussi pour connaître les pourcentages de flavonoïdes isolés dans les opérations de fractionnement, et pour vérifier l'état de pureté de glycosides d'apigénine isolés.

Combinée à la chromatographie, et en particulier à la CCM sur polyamide avec le 12/4/3/1, ce procédé a permis de connaître les proportions relatives des divers groupes de flavonosides de la drogue avant et après hydrolyse.

Il s'agit,certes,d'une méthode laborieuse quand il faut la réaliser après des isolements chromatographiques mais, lorsqu'on ne dispose pas d'un densitomètre, elle permet d'obtenir des résultats valables, comme le montre le tableau suivant :

T A B L E A U III - Comparaison de dosages spectrophotométriques en U. V.

effectués directement

et après isolement par CCM polyamide, solvant 12/4/3/1

(les quantités de flavonoïdes sont exprimées en mg d'aglucones pour 100 g de plante à 7 % d'eau.)

	Echantillon n° 1	Echantillon n° 2	Echantillon n° 3	Echantillon n° 4
Phase Ethérée par dosage direct	6,5 mg	6,00 mg	5,00 mg	8,00 mg
Phase Butanolique dosage après isolement chromatographique				
Zone I	4,56 mg	3,40 mg	2,80 mg	3,80 mg
Zone II	6,78 mg	6,78 mg	5,40 mg	5,80 mg
Zone III	3,85 mg	5,00 mg	4,90 mg	4,90 mg
Zone IV	86,00 mg	96,40 mg	106,40 mg	82,30 mg
Total des Zones	101,19 mg	111,58 mg	119,50 mg	96,80 mg
Phase Butanolique dosage après chromatographie, mais sur éluat de la plaque entière.	118,00 mg	117,20 mg	118,00 mg	106,00 mg
Phase Butanolique par dosage direct	110,00 mg	108,00 mg	112,00 mg	98,00 mg
Flavonoïdes totaux par addition: dosages directs des phases Ether et Butanol	116,50 mg	114,00 mg	117,00 mg	106,00 mg
Flavonoïdes totaux par dosage direct du lixiviat	115,00 mg	118,00 mg	120,00 mg	110,00 mg

N. B. : Ces échantillons font partie du lot n° 3.

2° - EXTRACTION DES FLAVONOIDES A PARTIR DE LA PLANTE

L'extraction s'effectue sur la poudre dégraissée, séchée à l'air avec ventilation jusqu'à perte de toute odeur de solvant.

1 - ESSAIS PRELIMINAIRES : RECHERCHE DES MEILLEURS SOLVANTS.

Des essais d'extraction sont effectués avec des solvants de polarités différentes : éther, acétone, acétate d'éthyle, alcool butylique, alcools éthylique et méthylique à différents titres, eau.

Deux grammes de poudre sont mis à macérer quelques heures avec 15 ml de solvant en agitant. Après décantation, les liqueurs surnageantes sont évaporées, le résidu repris par le minimum d'alcool éthylique à 80^{C} (0,5 ml). On chromatographie sur plaque de polyamide avec le 12/4/3/1 comme solvant, en présence de rutoside et d'apigénine comme témoins. On révèle au chlorure d'aluminium.

La plus grande partie des flavonosides présents chez *Spergularia rubra* (80 à 95 %) migre à la hauteur des corps très glycosylés (zone IV très importante).

De tels composés montrent ainsi une forte solubilité dans l'eau et l'alcool faible, et il est normal de constater que l'éther, l'acétone et même l'acétate d'éthyle ne peuvent extraire que de faibles quantités de tels hétérosides. Le butanol et l'alcool absolu ne sont pas non plus de bons solvants.

Partant de ces données, nous nous sommes attachés à chercher une méthode qui permette une extraction quantitative des flavonosides de *Spergularia rubra*, au moyen de l'eau ou des alcools de faible condensation en carbone plus ou moins dilués.

Nous n'avons utilisé l'extraction au Soxhlet que comme méthode comparative par crainte que le chauffage des flavonoïdes pendant plusieurs heures à l'ébullition, ne conduise à des isomérisations ou à des polymérisations.

Nous avons étudié de façon systématique l'extraction par macération et par lixiviation.

Pour cela nous avons traité le même échantillon successivement par les deux procédés et examiné les liqueurs extractives par CCM polyamide avec le 12/4/3/1. Lorsque la méthode nous semblait satisfaisante, nous avons dosé globalement les flavonosides de l'extractum puis les flavonoïdes extraits de celui-ci par l'éther et le butanol. Enfin dans un dernier stade, nous avons dosé les flavonoïdes après fractionnement en groupes au moyen de la CCM sur polyamide avec le 12/4/3/1.

2 - ETUDES DES METHODES D'EXTRACTION. CHOIX DU MEILLEUR SOLVANT.

a - Extraction par macération au moyen de l'eau et des alcools éthylique ou méthylique dilués.

Nous avons effectué une macération au 1/10e de *Spergularia rubra* dans l'eau, pendant 10 jours à 37° (m_1) ; le marc, séché, a été ensuite mis à macérer dans 10 parties d'alcool à 60°, pendant 4 jours, à 20° (m'_1).

Sur un autre échantillon provenant du même lot de plante, nous avons commencé par une macération, à 20°, dans l'alcool éthylique à 60° (m_2) ; nous avons poursuivi par une macération dans l'eau (m'_2).

Le troisième échantillon a été traité de façon analogue au second, mais la macération alcoolique a été effectuée à 37°.

Les marcs des trois expériences, ont, après séchage, été traités par lixiviation avec de l'alcool à 60°.

Toutes les liqueurs d'extraction, filtrées, ont été évaporées sous vide à température aussi basse que possible, puis reprises par un même volume d'alcool afin d'être chromatographiées.

Les résultats sont exposés dans le tableau suivant :

TABLEAU IV : Appréciation par CCM sur polyamide, solvant 12/4/3/1, des quantités de flavonoïdes extraites par macération d'une partie de plante dans dix parties de solvant (eau ou alcool à 60°).

Echantillon n° 1	Echantillon n° 2	Echantillon n° 3
eau à 37° m_1 ++	alcool 60° à 20° m_2 +++++	alcool 60° à 37° m_3 +++++
alcool 60° à 20° m'_1 ++++	eau à 37° m'_2 ±	eau à 37° m'_3 ±
lixiviation alcool 60° +	lixiviation alcool 60° +	lixiviation alcool 60° +

Ces résultats montrent, dans le cas de la macération, la supériorité de l'alcool à 60° (froid ou chaud) sur l'eau. Mais, dans aucun cas, la macération ne réalise un épuisement total puisque une lixiviation ultérieure permet d'extraire encore des flavonosides.

b - Extraction par lixiviation au moyen de l'eau et des alcools méthylique et éthylique dilués.

Nous avons pratiqué la lixiviation de la façon suivante : la poudre est imbibée d'une quantité de solvant laissant le mélange pulvérulent ; on laisse gonfler quelques heures, puis on transvase dans le percolateur. On verse du solvant jusqu'à apparition des premières gouttes de lixiviat. Le robinet fermé, on laisse macérer la poudre recouverte d'une épaisseur de quelques cm de solvant pendant douze heures environ. La lixiviation est ensuite conduite à vitesse moyenne (10 gouttes par minute). Lors des essais systématiques nous avons recueilli un poids de lixiviat égal à 10 fois celui de la poudre sèche mise en oeuvre. Mais, par la suite, pour obtenir un épuisement total de la poudre, nous avons été conduit à recueillir environ 12 fois son poids.

Comme pour la macération, le même échantillon a été successivement traité par l'eau ou l'alcool, avec séchage de la poudre entre deux extractions, toutes les lixiviations étant faites à la température du laboratoire.

T A B L E A U V : Appréciation par CCM de polyamide, solvant 12/4/3/1 des quantités de flavonoïdes extraits par lixiviations successives à l'eau, à l'alcool à 60°, à l'alcool à 95°.

Echantillon n°1	Echantillon n°2	Echantillon n°3
eau L_1 ++++	alcool Ethylique 60° L_2 +++++	alcool Ethylique 60° L_3 +++++
alcool Ethylique 60° L'_1 +	eau L'_2 $\pm$ $-$	alcool Ethylique 95° L'_3 $\pm$

Ces vérifications chromatographiques montrent que l'extraction réalisée à la température ordinaire par l'alcool à 60° est supérieure à celle réalisée par l'alcool à 95°. L'eau donne également de bons résultats, mais elle a le grand inconvénient de fournir des liqueurs troubles, épaisses, mucilagineuses, et colorées en brun. Il est très difficile de filtrer les lixiviats aqueux,et les fractionnements ultérieurs sont fortement gênés par la formation d'émulsions tenaces.

Ces examens chromatographiques ont été confirmés et précisés par des dosages effectués sur les lixiviats totaux et, dans certains cas, sur les fractions éthérées et butanoliques obtenues à partir de ces lixiviats. (tableaux VI et VII).

T A B L E A U VI : Vérification de l'efficacité de la lixiviation à froid au moyen de l'alcool à 60°.

(les quantités de flavonoïdes sont exprimées en mg d'aglucone, pour 100 g de plante à 7 % d'eau)

Dosage spectrophotométrique

	Echantillon n° 1	Echantillon n° 2
1re lixiviation	Alcool éthylique à 60°	
	fraction Ether..... 2 mg fraction Butanol... 240 mg	lixiviat, total : 250 mg
2e lixiviation	Alcool éthylique à 95°	Eau
	fraction Ether..... 1,75mg fraction Butanol... 0,95mg	fraction Ether..... 0,23mg fraction Butanol... 1,58mg
Total des flavonoïdes extraits	244,70 mg	251,80 mg

N. B. : Ces échantillons proviennent du lot n° 2.

T A B L E A U VII : Quantités de Flavonoïdes (exprimées en mg pour 100g, plante à 7 % d'eau) présentes dans les fractions éthérées et butanoliques obtenues à partir des divers lixiviats aqueux et alcooliques.

Dosage spectrophotométrique U. V.

Echantillon : n° 1	Extraction par alcool méthylique	Echantillon : n° 2	Extraction par alcool éthylique	Echantillon : n° 3	Extraction par alcool éthylique
Alcool méthylique 95c	(Ether = 0,75 mg (Butanol = 20,00 mg	Alcool éthylique 95c	(Ether = 0,27 mg (Butanol = 30,00 mg	Eau	(Ether 3,90 mg (Butanol = 158,00 mg
Alcool méthylique 60c	(Ether = 0,10 mg (Butanol = 145,00 mg	Alcool éthylique 60c	(Ether = 0,16 mg (Butanol = 132,00 mg	Alcool éthylique 60c	(Ether = 0,06 mg (Butanol = 25,00 mg
Eau	(Ether = 0,025 mg (Butanol = 0,040 mg	Eau	(Ether = 0,048 mg (Butanol = 0,050 mg	Alcool éthylique 95c	(Ether = 0,37 mg (Butanol = 0,35 mg
Total des Flavonosides extraits	= 165,915 mg 166 mg		= 162.528 mg 163 mg		= 187,68 mg 188 mg

N. B. : ces échantillons proviennent du lot n° 1

Nous avons également cherché à savoir si l'utilisation du solvant chaud (40° à 50° température maintenue au moyen d'un ruban chauffant autour du percolateur) améliorerait l'extraction des flavonoïdes. Nous avons constaté que la chaleur, qui a l'inconvénient d'augmenter fortement la dissolution de chlorophylle et de substances gommeuses ou mucilagineuses, semblerait plutôt diminuer la quantité de flavonoïdes extraits (ou dosables).

T A B L E A U VIII : Quantité de flavonoïdes (en mg d'aglucone rapportée à 100g de plante à 7 % d'eau)
extraits à chaud ou à froid par l'alcool à 60 %
Dosage spectrophotomètrique U. V.

	D_1	D_3	D_2	D_4
	à froid		à chaud	
Fraction éthérée	5 mg	6 mg	5 mg	8 mg
Fraction butanolique	117 mg	118 mg	105 mg	102 mg
Total	122 mg	124 mg	110 mg	110 mg

N. B. : Les échantillons D_1 D_2 D_3 D_4 proviennent du lot n° 3.

D_1 D_2 ont été dégraissées à l'éther de pétrole, D_3 D_4 au chloroforme ; ceci n'entraine pas de différences significatives.

En définitive nous avons adopté un compromis et utilisons l'alcool à 70°, assez dilué pour extraire convenablement les hétérosides flavoniques de *Spergularia rubra*, assez concentré pour extraire le minimum de substances gênant les fractionnements ultérieurs. Mais, avec l'alcool éthylique à 70°, l'extraction totale des flavonoïdes, vérifiée par la réaction au chlorure d'aluminium, nécessite une plus grande quantité de solvant.

Dans ces conditions nous obtenons des taux de flavonoïdes assez constants pour un même lot de plante.

T A B L E A U IX - Dosage spectrophotométrique U. V. de 4 échantillons lixiviés par alcool à 70 et provenant du lot n° 2

Quantités exprimées en mg pour 100 g de plante à 7 % d'eau.

Echantillon n° 3	Echantillon n° 4	Echantillon n° 5	Echantillon n° 6
Lixiviat	Fr. Ether 2 mg	Lixiviat	Fr. Ether 1,75mg
Total	Fr.Butanol 240 mg	Total lyophilisé-	Fr.Butanol 265 mg
282 mg	Total 242 mg	240 mg	Total 267 mg

3° - FRACTIONNEMENT DES FLAVONOIDES ET ISOLEMENT DES ACIDES ORGANIQUES A PARTIR DU LIXIVIAT.

Il faut déjà évaporer sous vide, à température la plus basse possible, l'alcool contenu dans le lixiviat sans jamais aller jusqu'au résidu sec. On ajoute éventuellement de l'eau afin que la solution puisse être facilement filtrée. La filtration s'effectue avant refroidissement.

Jamais le repos,même prolongé,de cette solution (plusieurs mois au réfrigérateur), ne nous a permis d'obtenir un précipité de flavonoïdes, comme cela se produit avec d'autres plantes contenant en quantité plus importante des pigments flavoniques de nature différente de ceux de *Spergularia rubra*.

1 - FRACTIONNEMENT PAR SOLVANTS NON MISCIBLES.

Sur la solution aqueuse extractive on commence, classiquement, par fractionner les flavonoïdes d'après leurs solubilités préférentielles dans divers solvants non miscibles à l'eau : éther, acétate d'éthyle, butanol. On opère avant et après hydrolyse acide car l'étude des aglucones solubles dans l'éther donne des indications précieuses.

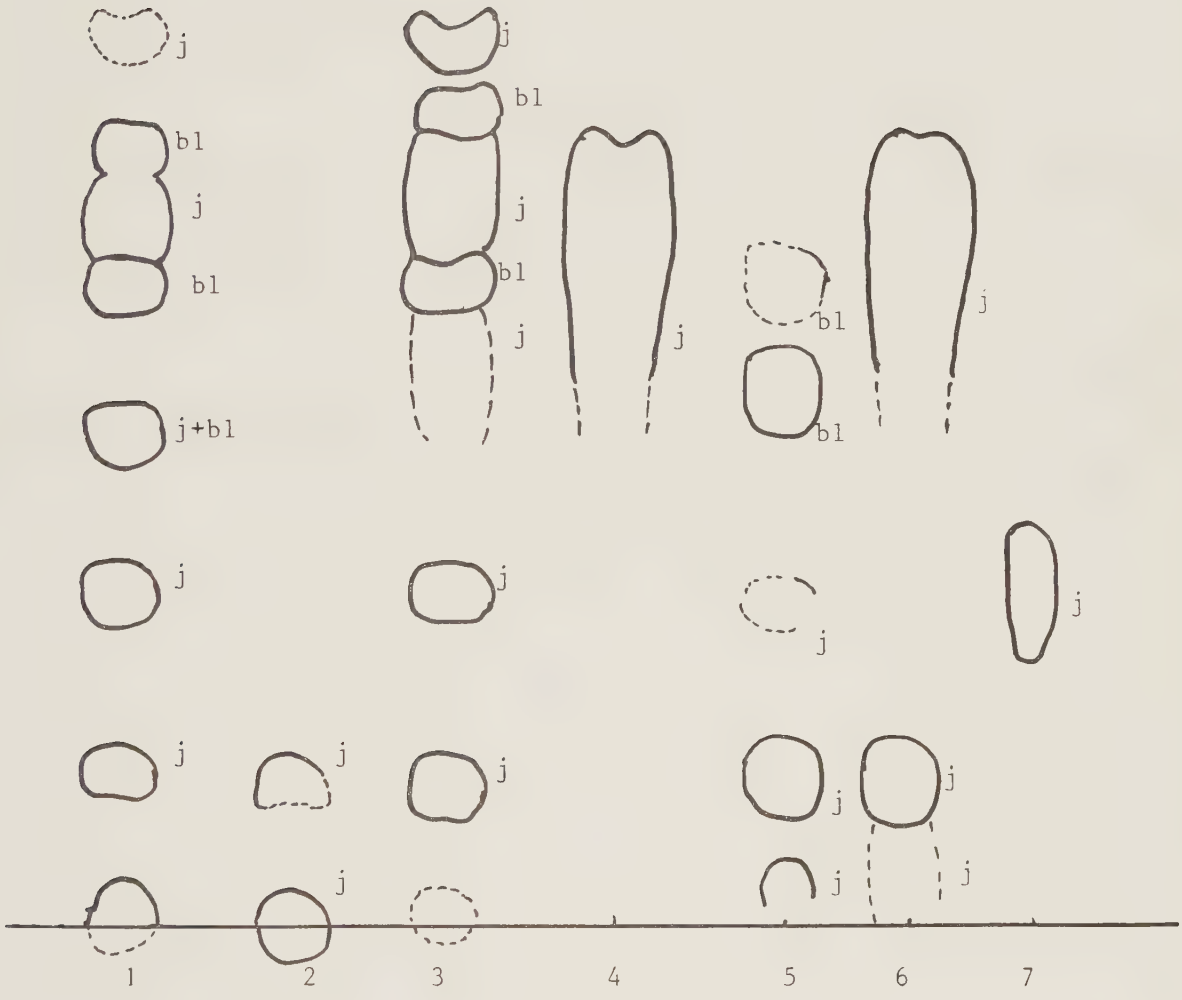
Malheureusement, pour *Spergularia rubra*, à partir de la matière première fournie par l'herboristerie, les seuls aglucones que nous avons trouvé, en très petite quantité d'ailleurs, sont déjà dans l'éther obtenu à partir du lixiviat avant hydrolyse chimique, soit qu'ils préexistent dans la plante, soit qu'ils apparaissent au cours du séchage et des opérations d'extraction.

Si on chauffe à ébullition en milieu acide, (deux heures, acide chlorhydrique N ou 2N) le lixiviat préalablement nettoyé à l'éther, on ne trouve dans la phase éthérée d'extraction après hydrolyse, que des traces de certains hétérosides peu glycosylés qui sont partiellement solubles dans ce solvant, mais pas d'aglucones.

Il est utile néanmoins d'employer l'éther pour extraire ces traces d'aglucones et se débarrasser au maximum des acides organiques libres présents dans le lixiviat (il faut vérifier que le pH est assez bas, aux environs de 3 - 4). L'éther enlève aussi la chlorophylle que les traitements préliminaires ont été incapables d'éliminer en totalité ; pour cela, il faut poursuivre l'extraction à l'éther jusqu'à ce que ce solvant reste incolore. Mais, dans ces conditions, l'éther, à cause de l'eau dont il se charge, dissout des quantités non négligeables de flavonosides même parmi ceux qui sont très glycosylés. Pour les récupérer, on doit ensuite laver les phases éthérées plusieurs fois avec de l'eau. Les hétérosides contenus dans l'eau de lavage seront ajoutés à ceux extraits ensuite par le butanol. La fig. 17 reproduit un chromatogramme sur C.M. de polyamide, solvant 12/4/3/1, de différentes phases éthérées : totale - lavée à l'eau - après hydrolyse - etc...

On peut fractionner encore les polyphénols présents dans l'éther en lavant la solution éthérée débarrassée des hétérosides, par une solution de bicarbonate de sodium. Les acides organiques passent dans la phase aqueuse sous forme de sels. Après acidification de la phase bicarbonatée, on peut réextraire les acides organiques qui se trouvent ainsi séparés des aglucones.

Fig. 17 CCM = polyamide
Solvant = 12/4/3/1
Révélation = $AlCl_3$



1 Extr. éthéré < lixiviat
2 = 1 après lavage à l'eau
3 eaux de lavage de 1
4 Extr. butanolique < lixiviat
5 Extr. éthéré < But-4 H^+
6 Extr. But. < But-4 H^+ déjà extrait à l'éther

j = tache jaune
bl = tache bleue

Nous n'avons pas obtenu les résultats escomptés malgré des essais avec des solutions de bicarbonate à différentes concentrations (2 %. 5 %. 10 %).

Le bicarbonate à 10 % solubilise à la fois acides organiques et aglucones. La solution à 5 % dissout aussi des aglucones. La solution à 2 % nous semble préférable, car elle n'enlève pratiquement que des acides organiques. Mais dans aucun cas nous n'avons pu extraire les acides organiques en totalité.

Si nous conservons le fractionnement à l'éther, nous avons, par contre, abandonné l'extraction par l'acétate d'éthyle qui ne peut dissoudre, ni de façon sélective, ni de façon quantitative, aucun des hétérosides de *Spergularia rubra*.

Après l'acétate d'éthyle, on utilise généralement le butanol pour extraire les hétérosides.

Les essais préliminaires nous ont déjà montré ses faibles possibilités comme solvant des glycosides de *Spergularia rubra*. En effet pour les flavonosides de la zone IV qui constituent l'essentiel des composés flavoniques de la plante, le coefficient de partage est en faveur de l'eau et des alcools dilués de faible condensation en carbone ; si l'on veut essayer d'extraire la totalité des flavonoïdes de la solution aqueuse il faut utiliser des quantités énormes de butanol (10 litres ou plus, pour un lixiviat correspondant à 100 g de plante...).

Si on ajoute une petite quantité de méthanol ou d'éthanol, l'extraction est un peu plus rapide, mais on solubilise beaucoup plus de substances non flavoniques fortement colorées en brun.

On obtient également des liqueurs extractives très colorées quand on utilise du propanol à la place du butanol. Cette méthode inspirée de BATE-SMITH et décrite par RIBEREAU-GAYON (64) permet des extractions satisfaisantes avec un volume beaucoup plus réduit de solvant. Elle consiste à saturer de chlorure de sodium la solution aqueuse que l'on traite par un volume égal de propanol jusqu'à ce que l'on obtienne deux phases.

Si on renouvelle plusieurs fois l'addition de propanol, on peut extraire pratiquement tous les hétérosides de *Spergularia rubra*. Si on traite au propanol un lixiviat apparemment épuisé par le butanol, on extrait encore des flavonosides. L'inverse n'est pas vrai.

Malgré la supériorité du propanol comme solvant des flavonosides de *Spergularia rubra* nous avons pratiqué, la plupart du temps, l'extraction au butanol.

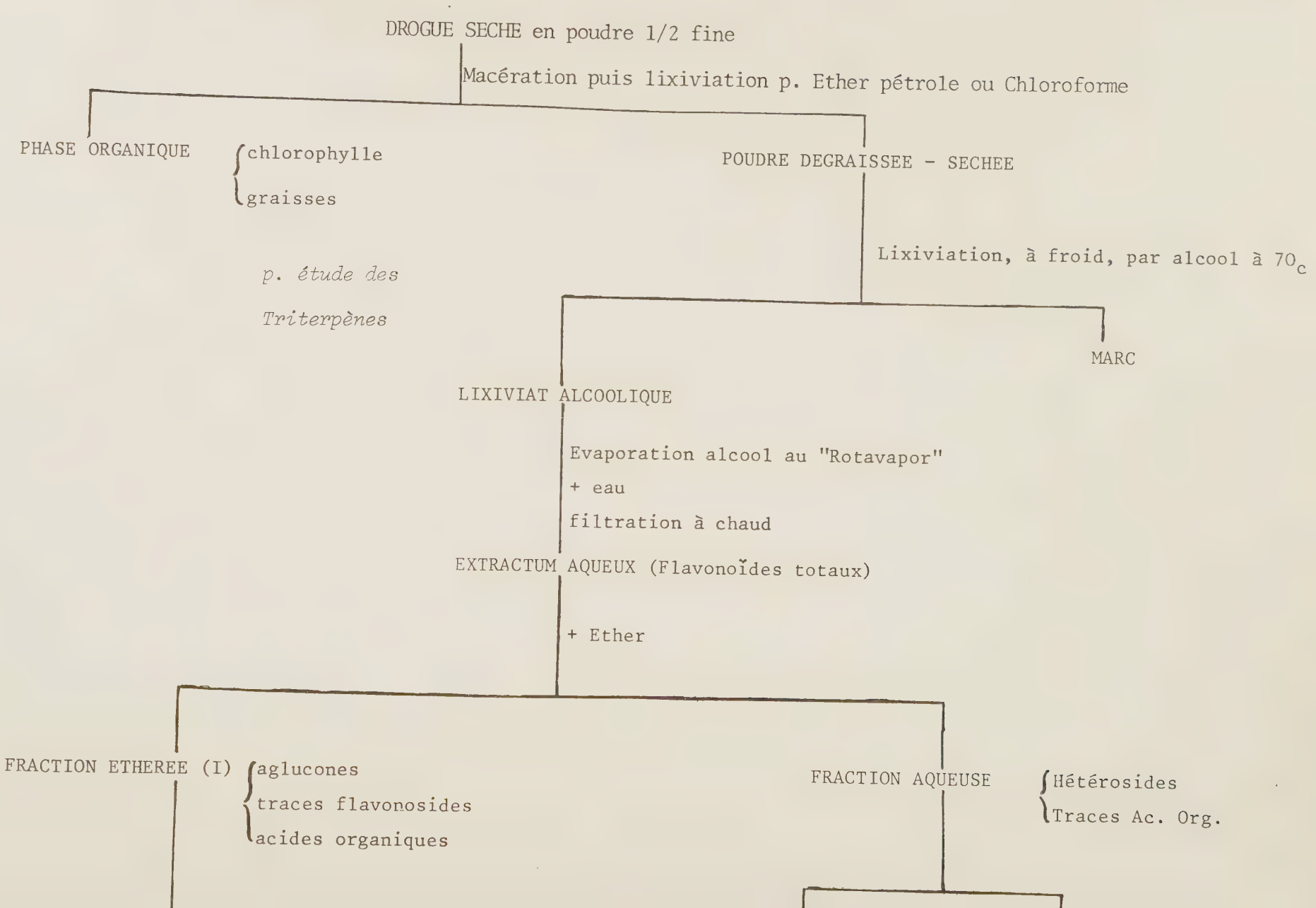
Avec la méthode de BATE-SMITH il est impossible, malgré toutes les opérations ultérieures de fractionnement, de se débarrasser totalement du chlorure de sodium. En effet, pour obtenir, à partir des flavonoïdes de *Spergularia rubra*, une solution concentrée il faut reprendre par un peu d'eau avant d'ajouter l'alcool. Nous avons observé que le chlorure de sodium résiduel ne pertubait pas les migrations chromatographiques, mais nous avons craint qu'il ne gêne les opérations délicates d'identification finale.

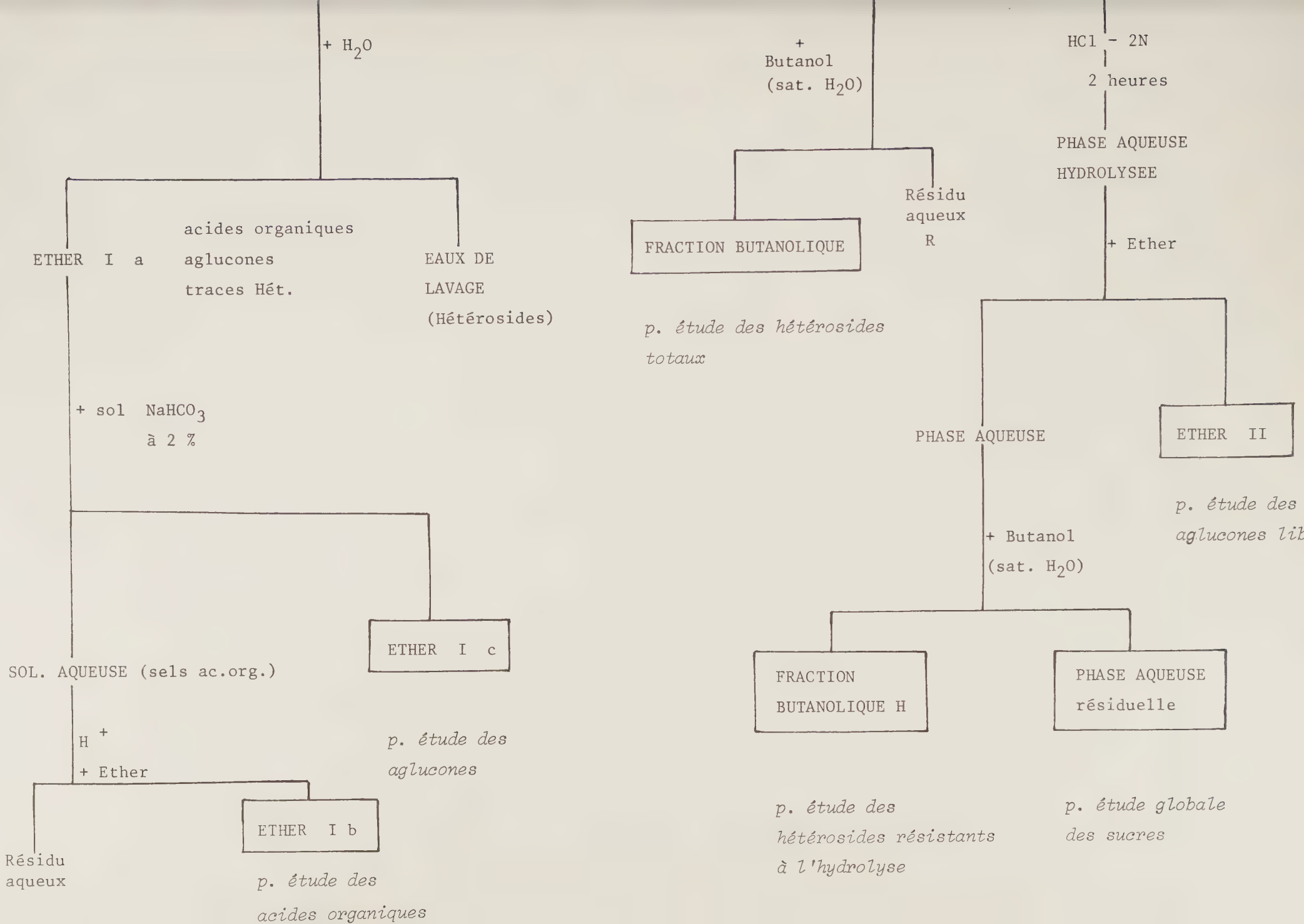
(64) RIBEREAU-GAYON (P.) Les composés phénoliques des végétaux, p. 62

RESULTATS OBTENUS PAR LA TECHNIQUE DE FRACTIONNEMENT AU MOYEN DE SOLVANTS NON MISCIBLES A L'EAU.

Dans le cas de *Spergularia rubra*, ces opérations de fractionnement doivent surtout être considérées comme des purifications qui permettent d'utiliser avec un meilleur résultat les méthodes chromatographiques qui, seules, sont capables de séparer les divers flavonosides.

Schéma de la méthode d'extraction et de fractionnement adoptée




+ H_2O
ETHER I a
acides organiques
aglucones
traces Hét.
EAUX DE LAVAGE
(Hétérosides)
+ sol $NaHCO_3$ à 2 %
ETHER I c
SOL. AQUEUSE (sels ac.org.)
H^+
+ Ether
ETHER I b
Résidu aqueux
p. étude des acides organiques
p. étude des aglucones
+ Butanol (sat. H_2O)
FRACTION BUTANOLIQUE
Résidu aqueux R
p. étude des hétérosides totaux
HCl - 2N
2 heures
PHASE AQUEUSE HYDROLYSEE
+ Ether
PHASE AQUEUSE
ETHER II
p. étude des aglucones lib
+ Butanol (sat. H_2O)
FRACTION BUTANOLIQUE H
PHASE AQUEUSE résiduelle
p. étude des hétérosides résistants à l'hydrolyse
p. étude globale des sucres

2 - SEPARATION DES DIVERS FLAVONOIDES PAR CHROMATOGRAPHIE.

Aglucones et hétérosides ayant été séparés par épuisement à l'éther du lixiviat préalablement repris dans l'eau, il faut maintenant séparer les divers flavonoïdes à l'intérieur de chaque groupe.

a - A G L U C O N E S

On étudie les aglucones qui sont présents dans la phase éthérée obtenue à partir du lixiviat non hydrolysé, puisque le chauffage à l'ébullition en milieu chlorhydrique 2N et même 4N ne nous a pas permis de libérer davantage de ces composés.

La séparation, l'isolement et l'identification des aglucones sont fortement gênés par la chlorophylle solubilisée dans l'éther, et surtout par la présence d'acides organiques (ou de substances de type coumarines, possédant une fluorescence bleue sous U. V.) que le traitement au bicarbonate n'a pas pu éliminer.

Tous nos essais pour éliminer la chlorophylle par action de "solvants sélectifs" sur la phase éthérée ou le résidu de celle-ci, ont échoué : ou bien on ne dissout pas de chlorophylle, ou bien on dissout, au moins en partie, les aglucones avec la chlorophylle.

On arrive cependant à se débarrasser de la chlorophylle au cours des opérations de fractionnement des aglucones sur colonne de gel de silice, et par chromatographie sur papier avec des solvants aqueux acides. Par contre nous ne sommes jamais arrivés à

éliminer complètement les acides organiques (ou les substances type coumarines) dont certains possèdent les mêmes caractéristiques chromatographiques que les aglucones flavoniques. De plus, les acides organiques existent dans les phases éthérées d'extraction de *Spergularia rubra*, même après l'action du bicarbonate de sodium, en quantité bien supérieure à celle des aglucones.

Méthodes analytiques employées pour surveiller l'extraction et le fractionnement des aglucones.

Nous utilisons la chromatographie bidimensionnelle soit sur papier, soit, de préférence, sur plaque de cellulose ou de polyamide car la méthode est plus rapide. Dans le premier sens on fait migrer les flavonosides avec un solvant aqueux qui laisse les aglucones sur la ligne de départ ; dans le deuxième sens, on utilise un solvant qui fait migrer les aglucones (solvant anhydre si on utilise CCM sur polyamide). Nous avons utilisé les systèmes solvants suivants :

1°- sur papier Whatman n°1, ou sur plaque de cellulose.

1er sens : acide acétique à 2 % ou à 5 % (AA 2 - AA 5).

2e sens : solvant de Partridge (butanol 4, acide acétique 1, eau 5 ; phase supérieure) ou le mélange butanol, acide acétique à 27 % (1 - 1) (=BAW 27 %).

Lss résultats sont bien meilleurs sur papier.

2°- sur papier Whatman n°1 ou sur plaque de cellulose.

1er sens : acide acétique 2 % ou 5 %.

2e sens : acide acétique 30 % (AA 30).

3°- sur plaque de polyamide.

1er sens : solvant 12/4/3/1.

2e sens : solvant "apolaire" de EGGER (60) (61): benzène 60, méthyl-éthylcétone 20, méthanol 20, acide acétique 1.

Alors que le 12/4/3/1 différencie le type de glycosylation, le solvant apolaire fait migrer les corps selon le type d'aglucones ; la migration se fait en raison inverse du nombre d'hydroxyles du squelette flavonique, la glycosylation influant relativement peu. L'utilisation du solvant apolaire de EGGER ne donne des indications sûres même en présence de témoins, que si l'on est assuré de n'avoir en mélange que des aglucones.

On commence le fractionnement des aglucones flavoniques par une chromatographie sur colonne de gel de silice qui permet d'éliminer la chlorophylle et d'autres impuretés lipophiles qui ont pu échapper à l'action de l'éther de pétrole lors du dégraissage de la plante.La phase éthérée évaporée et reprise par l'hexane est passée sur colonne de gel de silice Merck, 70 à 325 mesh. L'adsorbant est préalablement lavé à l'alcool, à l'éther, au benzène, puis à l'hexane. La colonne est préparée dans l'hexane, et on commence l'élution par ce solvant ; on passe ensuite au benzène, à l'éther, à l'acétate d'éthyle, à l'alcool absolu et on termine par l'alcool à 80°.

Hexane et benzène n'entrainent pas de flavonoïdes ; l'élution de ces corps commence avec l'éther qui élue, sans séparation entre eux, les divers aglucones, avec des flavonosides peu glycosylés présents dans l'extractum éthéré ; l'élution de ces derniers est pratiquement achevée par l'acétate d'éthyle. L'éther élue les acides organiques en même temps que les aglucones.

Après avoir vérifié la présence d'aglucones dans les différents éluats, et réuni les fractions identiques, on sépare les divers aglucones.

L'isolement ne peut pas se faire avec le solvant de EGGER sur plaque de polyamide, pour la même raison que les hétérosides, si on veut ensuite identifier les composés par des méthodes spectrales. De plus les flavonoïdes ne sont pas nettement séparés des acides organiques,et si on utilise cette méthode en monodimensionnelle,des composés comme l'apigénine et la vitexine sont mal séparés car ils donnent des taches jointives sinon partiellement superposées.

Pour isoler les uns des autres les divers aglucones entre eux et éliminer au maximum les acides organiques, nous avons essayé trois techniques, mais aucune ne nous a permis d'obtenir des corps assez purs pour avoir des spectres vraiment corrects.

1- Chromatographie sur couche mince de gel de silice H. Merck.

a- Le mélange toluène 40, chloroforme 25, acétone 35 indiqué par EGGER (65) nous a donné de bons résultats à condition

(65) EGGER (K) In Stahl,ouvrage cité (57a) p. 694

d'ajouter 1 % d'acide acétique. Les glycosides restent ainsi sur la ligne de départ, ou migrent à peine, les aglucones (Rf 0,6 à 0,9) en sont nettement séparés, mais les acides organiques donnent des bandes jointives à celles des aglucones de *Spergularia rubra* :

g_1 Rf = 0,75 (# Ap.)

g_2 Rf = 0,60

b- Solvant de migration : benzène 72, pyridine 18, acide formique 12, indiqué aussi par EGGER (65).

Les hétérosides ne se déplacent pas, ou à peine, les aglucones ont des Rf allant de 0,3 à 0,75 et les acides organiques migrent plus haut que nos aglucones.

g_1 Rf = 0,50 (# Ap.)

g_2 Rf = 0,40

2- Chromatographie sur papier Whatman n°1.

On fait migrer une première fois, à front perdu, pendant 18 à 20 heures, avec AA 5, qui élimine certains acides organiques mobiles de type cinnamique, et sépare les hétérosides des aglucones qui restent à la base. Après séchage, on fait migrer une deuxième fois dans le même sens, mais avec de l'acide acétique à 30 % pendant 12 heures environ. Les aglucones se déplacent alors, et se séparent en deux bandes :

g_1 révélée en jaune par l'acétate de plomb Rf_{Ap} = 1,05

g_2 révélée en orange rose par l'acétate de plomb Rf_{Ap} = 0,48

On marque l'emplacement des aglucones qui se détachent en sombre sous U. V., et on élue avec du méthanol à 95°. Les solutions évaporées et reprises dans le minimum d'alcool serviront, après repurification, à identifier les corps.

b - HETEROSIDES

Nous avons fractionné les divers hétérosides avant et après hydrolyse des liqueurs extractives.

L'hydrolyse est effectuée :

- soit sur le lixiviat débarrassé par l'éther des aglucones préexistants,
- soit sur la phase butanolique obtenue à partir de ce lixiviat déjà épuisé par l'éther.

On chauffe à l'ébullition, sous reflux, pendant 2 heures, après addition d'acide chlorhydrique et de méthanol en quantité calculée pour que le milieu réactionnel corresponde à une solution acide 2 N dans le méthanol à 50 %.
Après hydrolyse, on évapore l'alcool, et on extrait par l'éther puis par le butanol (= ♀ But. H.).

Mais nous avons, le plus souvent, opéré la séparation des divers hétérosides avant hydrolyse en utilisant la phase butanolique d'extraction, préférant faire les essais d'hydrolyse, sur des flavonosides isolés et purifiés.

L'impossibilité d'utiliser la chromatographie sur couche mince de polyamide qui donne des flavonosides souillés de "liant", non identifiables au moyen de méthodes spectrales, nous a amené à essayer de séparer les divers composés flavoniques par passage sur colonne de polyamide.

L'élution avec des solvants de polarité croissante ne nous a pas donné de bons résultats. Les solvants apolaires ou peu polaires (n hexane, benzène, chloroforme, éther, acétate d'éthyle) ne sont pas capables d'éluer les flavonosides très glycosylés de

Sp. rubra, et dès que l'on commence à utiliser un mélange avec du méthanol (acétate d'éthyle 90 - méthanol 10), les hétérosides sont élués en bloc.

Les résultats sont acceptables si on commence à éluer par l'eau assez longtemps et que l'on poursuit avec de l'alcool éthylique ou méthylique très dilué (5% puis 10%...).

Dans ces conditions l'eau réalise une purification en entrainant tout d'abord des composés non flavoniques colorés en brun-jaune ; l'eau dissout ensuite les composés très glycosylés dont l'élution est achevée par l'alcool à 5 % puis à 10 %.

Mais, pas plus que la chromatographie sur plaque avec le même adsorbant, la chromatographie sur colonne de polyamide ne nous a permis d'isoler directement de composé flavonique pur : la séparation se fait par groupe de produits (tri et diglycosylés sur des carbones différents, diglycosylés sur le même carbone, monoglycosylés...). Dans le groupe des corps très glycosylés on observe cependant un enrichissement en certains corps selon les fractions. Un deuxième puis un troisième passage sur colonne de polyamide des diverses fractions n'a pas apporté d'amélioration pour séparer entre eux les corps d'un même groupe.

Le déroulement des élutions est suivi par CCM de polyamide avec le 12/4/3/1 comme solvant, révélation avec $AlCl_3$. On observe ainsi l'apparition des divers groupes de flavonosides (Zones IV. III...).

Pour connaître rapidement la composition en flavonosides à l'intérieur de chaque groupe (Zone IV essentiellement)

nous nous sommes servis de la chromatographie sur plaques de cellulose, avec l'acide acétique 2 % comme solvant de migration, révélation avec l'acétate basique de plomb. Cette méthode avec laquelle nous n'avons pas pu réaliser à ce stade un fractionnement efficace des divers flavonosides, a permis, par contre, de réunir de façon plus sure les fractions dont la composition paraissait identique par CCM de polyamide avec le 12/4/3/1.

Ces fractions débarrassées de la plupart des impuretés non flavoniques contiennent des flavonosides de constitution voisine.

Nous n'avons pu séparer ces composés chimiquement très proches qu'avec des temps prolongés de migration ; ceci nécessite l'emploi de la chromatographie descendante sur papier, très souvent à front perdu. Les isolements effectués par chromatographies ascendantes nous ont toujours donné de moins bons résultats.

Les solvants de type Partridge, Butanol-Acide acétique 27 % aa, T. B. A. (66), séparent très mal les uns des autres les flavonosides très glycosylés de *Sp. rubra,* car la plupart de ces corps migrent très mal avec des solvants contenant peu d'eau. Pour les flavonosides de la zone IV les séparations ont été satisfaisantes en utilisant l'eau avec 5 % d'acide acétique pour empêcher les trainées, à condition de chromatographier sur papier Whatman n° 20 à front perdu, pendant 12 à 14 heures.

Le papier Whatman n° 3 MM qui permet de chromatographier des quantités plus importantes de substances, donne des séparations moins franches. Le Whatman n° 1, plus rapide que le n° 20, donne de moins bons résultats pour les flavonosides très glycosylés

T. B. A. = t. Butanol 3, Acide Acétique 1, Eau 1.

(66) MABRY (T.J.) et coll., "The systematic identification of flavonoïds" - p. 4.

lorsqu'on les chromatographie avec un solvant aqueux.

Nous avons donc utilisé conjointement et successivement la chromatographie sur colonne de polyamide, puis la chromatographie sur papier Whatman n° 20 avec l'acide acétique 5 %, pour isoler les hétérosides présents dans les phases butanoliques d'extraction.

Mais on peut, à la rigueur, effectuer la chromatographie sur colonne à partir du lixiviat simplement extrait à l'éther ; dans ce cas il faut une quantité de polyamide plus importante pour retenir les impuretés. On peut également chromatographier directement sur papier la phase butanolique, sans passage préalable sur colonne, mais les purifications ultérieures sont alors plus laborieuses.

PARTIE EXPERIMENTALE

1 - Chromatographie sur colonne.

Pour une solution extractive correspondant à 350 g de *Sp. rubra*, nous utilisons une colonne à robinet dont le diamètre intérieur est de 40/45 mm pour une hauteur utile 1 m 20 à 1 m 30. La quantité de poudre de polyamide nécessaire pour remplir la colonne au 2/3 est de l'ordre de 300 g. Nous employons du polyamide WOELM qui serait un polycaprolactame.

Il est indispensable de laver l'adsorbant au méthanol et d'éliminer les particules fines présentes dans la poudre. Pour cela on agite le polyamide avec 5 à 6 fois son volume de méthanol, et, après repos modéré, on décante. On renouvelle l'opération jusqu'à ce que l'adsorbant se dépose rapidement en totalité en laissant un surnageant limpide. On lave ensuite avec le solvant qui servira à commencer l'élution. Dans le cas des flavonosides de *Sp. rubra*, on lave donc à l'eau et il faut, après lavage, laisser au moins douze heures en contact eau et polyamide avant de remplir la colonne. Il est d'ailleurs assez difficile d'avoir des colonnes parfaites avec du polyamide en suspension dans l'eau, et nous avons constaté que la colonne restait plus homogène au cours des opérations d'élution si on ne l'utilisait pas immédiatement après remplissage ; un repos de 24 heures nous semble souhaitable.

La solution à chromatographier, concentrée, est additionnée de poudre de polyamide préalablement lavé et séché jusqu'à obtenir un mélange homogène mais encore un peu liquide, que l'on verse avec précaution au sommet de la colonne ; on commence immédiatement la lixiviation.

On utilise successivement l'eau, puis des dilutions aqueuses d'alcool éthylique ou méthylique obtenues en mélangeant :

95 ml H_2O avec 5 ml alcool absolu

90 ml - - 10 ml - -

85 ml - - 15 ml - -

70 ml - - 30 ml - -

40 ml - - 60 ml - -

On change de solvant selon les indications données par la CCM de polyamide avec 12/4/3/1.

Les premières fractions obtenues avec l'eau, très colorées, en jaune verdâtre, marron, puis jaune, contiennent des acides organiques et des substances non flavoniques qui, sans addition de Cl_3Al, présentent en U. V. une fluorescence jaune importante dont l'intensité n'augmente pas en présence de ce réactif. A ce stade on recueille des fractions de 20 à 50 ml en observant le déplacement des bandes colorées dans la colonne ; on recueille également des fractions de petits volumes au moment des changements de solvant, mais en cours d'élution par un solvant donné on peut recueillir des fractions de 100 à 250 ml ou même plus. L'inconvénient de cette méthode est de nécessiter des volumes très importants d'éluant aqueux : 5 à 15 litres de chaque solvant dans les conditions opératoires que nous utilisons.

La fig. 18 reproduit un chromatogramme sur C.M. de polyamide avec 12/4/3/1, montrant la corrélation entre le solvant utilisé et les groupes de flavonosides élués.

Flavonosides élués par l'eau et CH_3OH dilué à (conc.) croissante à partir d'un extractum butanolique (avant ou après H^+) passé sur colonne de polyamide.

Fig. 18 CCM = polyamide
Solvant = 12/4/3/1
Révélation = $AlCl_3$

2 - Chromatographie descendante sur papier Whatman avec l'acide acétique dilué :

Première et essentielle précaution, il ne faut utiliser que des papiers préalablement lavés :

1°/ avec une solution aqueuse de sel sodique d'E.D.T.A. à 5 %, pour éliminer toute trace de fer qui donne, surtout avec les flavonoïdes orthodihydroxylés, des produits noir-verdâtre que l'on arrive pas à purifier.

2°/ à l'eau, pour entrainer le complexe formé, et éliminer toute trace d'E.D.T.A. résiduel qui empêche ultérieurement la chélation des flavonoïdes avec le chlorure d'aluminium.

3°/ à l'alcool (80° à 95° selon l'usage ultérieur), afin d'éliminer des impuretés qui, sans cette précaution, sont entrainées lors de l'élution des flavonosides, et qui, absorbant très fortement à partir de 280 - 270 nm, empêchent d'obtenir un spectre U. V. convenable de la Bande II.

Le lavage à l'alcool doit être effectué sur des feuilles séchées après passage de l'E.D.T.A. et de l'eau.

Sur les feuilles de papier ainsi préparées, on réalise, à l'aide d'un appareil automatique, (Autoliner Desaga) un dépôt linéaire sur 44 cm. On peut chromatographier des quantités de 700 à 800 µg de flavonoïdes totaux par feuille, quand on utilise du Whatman n° 20 ou n° 1.

Pour les fractions contenant essentiellement des flavonosides très glycosylés correspondant à la zone IV de

EGGER, on chromatographie sur Whatman n° 20 avec l'acide acétique 5 % (= A A 5) pendant 12 à 14 heures s'il s'agit de solutions non hydrolysées. En effet, dans ce cas, les plus mobiles des flavonosides arrivent non loin de l'extrémité de la feuille de papier, (migration 32 à 38 cm) alors que les flavonosides les moins glycosylés, correspondant à la zone II de EGGER ont assez peu migré (2 à 10 cm). Mais les solutions extractives non hydrolysées contiennent très peu de ces derniers composés.

Si on chromatographie des solutions hydrolysées, on peut faire migrer 15 à 16 heures, car la zone IV ne contient plus de flavonoïdes de Rf très élevé ; on obtient ainsi une meilleure séparation des composés de Rf peu élevé dont la proportion a augmenté par hydrolyse.

Après développement, les chromatogrammes sont séchés avec ventilation pour chasser au maximum l'acide acétique, puis observés directement sous U. V, comparativement à une petite bande témoin découpée sur toute la longueur de la feuille et révélée à l'acétate basique de plomb (3c). On peut ainsi séparer des composés donnant des bandes presque jointives, non discernables par le chlorure d'aluminium qui donne une seule zone plus ou moins intensément jaune alors que l'acétate basique de plomb fait apparaître des bandes jaunes et des bandes orangées plus ou moins rouges. En première approximation, on peut dire que les bandes jaunes correspondent à des dérivés du type apigénine, alors que les bandes rouge-orangé correspondent à des dérivés du type lutéoline (orthodiphénoliques).(67) (68) (69).

(3c) "Soluté d'acétate basique de plomb" de la Pharmacopée française Ed. 1965, p. 1040

(67) HORHAMMER (L), WAGNER (H) In recent developpement in the chemistry of natural phenolic compounds. Ed. Ollis (W.D) Chap. X p. 187 et 191

(68) ROSPRIM (L) Uber die Struktur neuer und bekannter Flavon-C-Glykoside (1966), p. 7 et 31

(69) DULL (P) Neue Flavon-C-Glykoside... (1970), p. 4 et 6

On découpe les bandes qui apparaissent en sombre sous U. V. et qui correspondent aux bandes jaunes ou rouges après révélation. Au moyen d'un fil de nylon qui traverse le sommet et le bas des bandes, on les réunit en paquet très serré, que l'on suspend à l'intérieur d'une colonne de diamètre suffisant pour que les papiers ne touchent pas les bords ; on élue en faisant couler le solvant goutte à goutte, au moyen d'une ampoule à décanter par exemple. On utilise, selon les bandes, le méthanol à 50^{C}, à 80^{C}, ou à 95^{C}.

L'éluat est concentré sous vide à température aussi basse que possible.

Résultats :

A la fin des opérations de fractionnement conduites sur colonne de polyamide puis sur papier Whatman n° 20 avec l'acide acétique 5 %, on possède des éluats plus ou moins purs correspondant à divers flavonosides que l'on va purifier. A ce stade, les caractéristiques des divers flavonosides rechromatographiés sur W 20 avec AA_5 sont exposés dnns le Tableau X. Les Rf sont exprimés par rapport au rutoside puisque la migration se fait à front perdu.

Le tableau XI résume le fractionnement des flavonosides à partir des phases butanoliques hydrolysées et non hydrolysées.

TABLEAU X

		Rf_{rut} W 20 - AA_5	Couleur avec $AlCl_3$	Couleur avec acétate basique de plomb	Appréciation des quantités relatives des divers flavonosides	
uniquement avant hydrolyse chimique acide	Bande 4	1,44 - 1,56	jaune citron	jaune	+ + + +	
	Bande 4 *	1,40 - 1,50	ne se distingue pas de B_4 et B_3	rouge orangé	+ +	
	Bande 3	1,25 - 1,40	jaune foncé	jaune	+ + +	
					avant hydrolyse	après hydrolyse
avant et après hydrolyse chimique acide	Bande 2	1,02 - 1,1	jaune citron	jaune	+ + + + + +	+ + + + + + + +
	Bande 1	0,74 - 0,82	jaune foncé	orangé	+ + + + +	+ + + + + + + + +
	Bande 05	0,50 - 0,60	jaune pâle	orangé-beige	±	+
	Bande 04	0,40 - 0,45	jaune pâle	jaune pâle	± ±	±
	Bande 03	0,26 - 0,32	jaune	jaune	+ +	+ + + +
	Bande 02	0,12 - 0,19	jaune	02 jaune / 02bis orange selon les lots	+	+ + +
	Bande 01		trainée jaune clair	trainée orange		

T A B L E A U X I : Schéma du fractionnement des flavonosides par chromatographie sur colonne de polyamide ; Correspondance avec les groupes de flavonosides selon EGGER (CCM polyamide 12/4/3/1) et les bandes obtenues sur W_{20} avec AA_5.

Extractum butanolique sans hydrolyse			Extractum butanolique après hydrolyse	
W_{20} AA_5	CCM polyamide 12/4/3/1	Colonne de polyamide	CCM polyamide 12/4/3/1	W_{20} AA_5
Bande n° : 4. 4*. 3. 2. 1.	Zone n° : IV sup. ; IV sup.med. ; IV totale	H_2O	Zone n° : IV sup. ⟶ Bande n° : 1^{++}. 2. ; IV sup. med. ⟶ 1^{++}. 2. 05. ; IV totale ⟶ 1^{++}. 2. 05.	
1. 2. 3. (4 et 4*) ↘	IV sup. inf.	méthanol à 5 %	IV sup. inf. ⟶	1. 2. 05.
1. 2. (3. 4*. 4) ↘ 05	IV totale avec IV inf.$^{++}$	méthanol à 10 %	IV inf. début III	1.2. 05. ; 02.
1. 2. (3) ↘ 05. 03	IV ↘ ; III	méthanol à 15 %	IV ↘ III	1. 2. 04. 03^{++}. 02^{++}
traces 1. 2. 03. 02.	III ↘ traces IV ; II	méthanol à 30 %	↘ III ↗ II ; II	traces 1. 2. 05) 04. 03^{++}. 02^{++}.
traces de 1. 2. 3. 4	traces II. ; III et IV $^{+}_{-}$	méthanol à 60 %	traces IV	rien de net

C - PURIFICATION ET ESSAIS D'IDENTIFICATION DES FLAVONOIDES ISOLES.

a - AGLUCONES.

Pour purifier un composé donné nous avons, soit à nouveau traité le produit par la même technique qui avait servi à l'isoler, soit employé successivement les diverses techniques exposées pour le fractionnement des aglucones.

Aucune méthode n'a été efficace pour éliminer en totalité les acides organiques, et les spectres U. V. des substances g_1 et g_2 ainsi purifiées, présentent souvent des pics assez étalés avec diminution de l'absorption correspondant à la bande I ou à la bande II. (Tableau : XII).

T A B L E A U XII : Spectres U. V. des substances g_1 et g_2.

Substance g_1	λ maximums (nm) II	λ maximums (nm) I	Interprétation
CH_3OH à 96°	274	330	Bande I : flavone à noyau B. peu hydroxylé type apigénine. Bande II unique : confirmation.
$CH_3OH + AlCl_3$	275 - 302	350 - 382 (Ia)	4 pics importants. λIa = + 46 nm. 5 hydroxyflavone. –OH 5 libre.
$CH_3OH + AlCl_3 + HCl$	pratiquement inchangé		Complexe aluminique non détruit = pas de groupe O.dihydroxylé 3'- 4'.
Substance g_2 CH_3OH à 96°	(260) 269	350	Bande I : noyau B. type lutéoline. Bande II : 1 pic et 1 inflexion prononcée. 2 substituants en 3'- 4'.
$CH_3OH + AlCl_3$	270 (302)	330 - 420 (Ia)	Complexe aluminique avec fort déplacement bathochrome de Bande I.
$CH_3OH + AlCl_3 + HCl$	(260) 275	356 (385) (Ia)	–OH 5 libre. Effet hypsochrome sur Bande Ia avec HCl ($\Delta\lambda$ Ia = 35nm) : groupe O.dihydroxylé en 3'- 4'.

N. B : Les inflexions sont signalées par les chiffres entre parenthèse.

T A B L E A U XIII : Réactions colorées données par les substances g_1 et g_2.

	g_1	g_2
U. V. avant révélation	sombre	sombre
U. V. + vapeurs NH_3	jaune vert	jaune foncé
Chlorure d'aluminium	jaune	jaune
Réactif de BENEDICT	fluorescence jaune - clair	extinction de la fluorescence
Acétate basique de plomb	jaune	orangé

Ces réactions colorées donnent les mêmes indications que les spectres U. V..

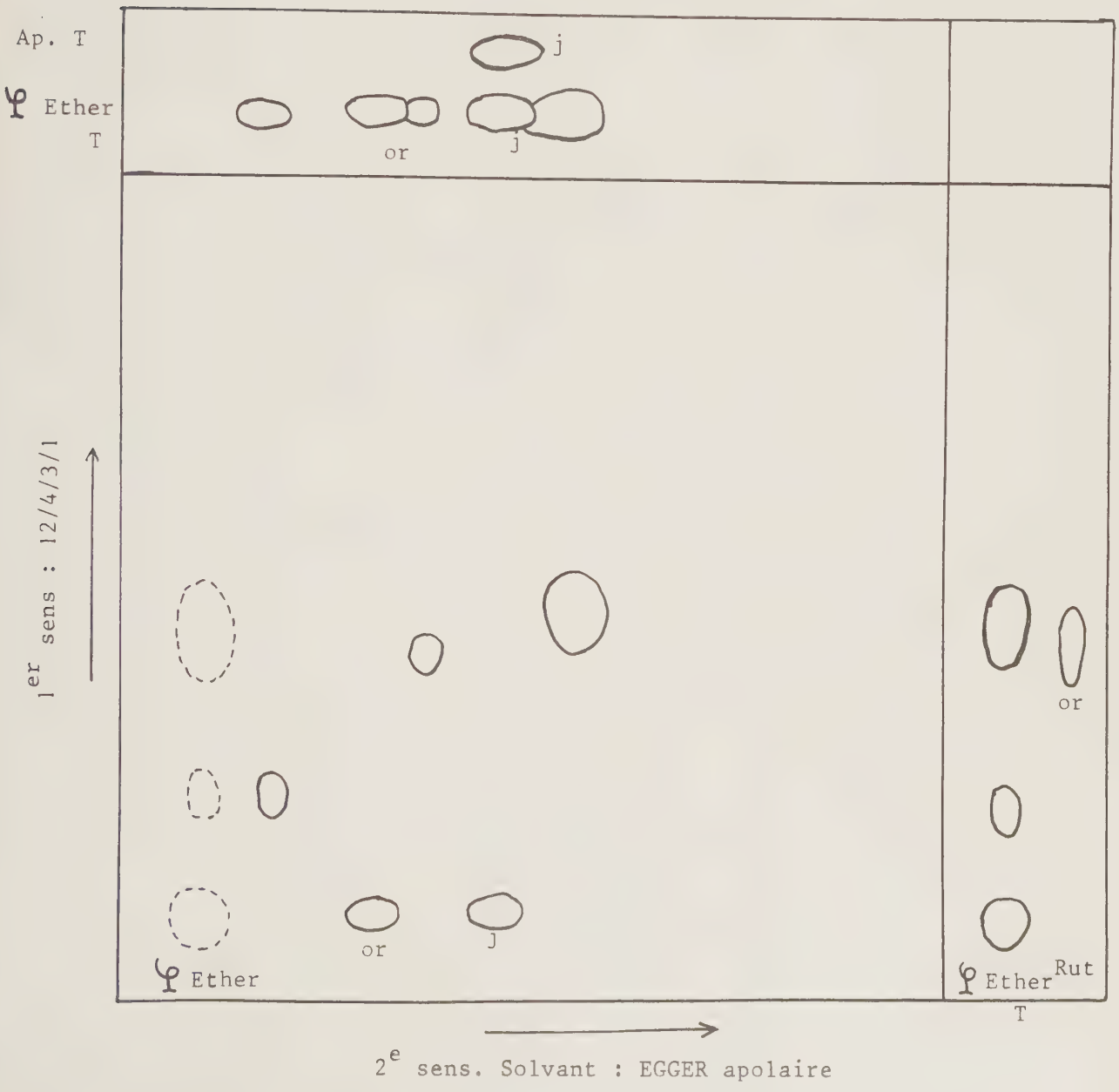
La chromatographie permet de confirmer seulement l'identification de la substance g_1 comme étant l'apigénine, car nous ne possédons pas de témoin de lutéoline.

Le Tableau XIV indique les Rf de g_1 , g_2 et de l'apigénine dans différentes conditions opératoires.

La fig. 19 reproduit une chromatographie bidimensionnelle des aglucones sur plaque de polyamide avec 12/4/3/1 (1^{er} sens) et EGGER apolaire (2^{e} sens).

Fig. 19

Séparation et identification des aglucones présents dans une phase éthérée totale par CCM bidimensionnelle sur polyamide ;
Révélation : Acétate basique de plomb dans l'alcool



T A B L E A U XIV : Comparaison des Rf. des substances g_1, g_2 et de l'apigénine.

	W_1	CCM polyamide	CCM gel de silice H.		
	AA_5 puis AA_{30}	EGGER apolaire	Toluène 40 / Chloroforme 25 / Acétone 35 / Ac. acétique 1	Benzène 72 / Pyridine 18 / Ac. formique 12	Toluène 8 / Acétate d'Ethyle 6 / Méthanol 1
Ap	référence : 1	0,37	0,76	0,50	0,42
g_1	Rf vit : 1,05	0,37	0,75	0,50	0,41
Ap + g_1	——	Spot non dédoublé	——	Spot non dédoublé	——
g_2	Rf vit : 0,48	0,27	0,60	0,40	0,31

L'examen de ce tableau prouve l'identité de l'apigénine et de la substance g_1 (même Rf dans 5 systèmes solvants différents).

Pour g_2 on peut seulement remarquer que dans les conditions de migration utilisées, cette substance possède des Rf inférieurs à ceux de l'apigénine, ce qui est en accord avec les données de divers auteurs s'il s'agit bien de lutéoline.

Il est d'ailleurs logique de penser qu'une plante qui, nous allons le voir, ne contient que des C-hétérosides de flavones dérivant de l'apigénine ou de la lutéoline, contient ces mêmes aglucones soit à l'état libre, soit l'état d'O-flavonosides qui seraient hydrolysés au cours du séchage de la plante ou au cours des opérations d'extraction. (67)

b - H E T E R O S I D E S

I-METHODES GENERALES DE PURIFICATION.

1 - Chromatographie descendante sur papier W_{20} ou W_1 avec l'acide acétique dilué.

Pour les flavonosides très glycosylés des bandes 4 à 1 inclus, les premières purifications consistent à chromatographier à plusieurs reprises (2 ou 3 fois) les éluats de chaque bande dans les conditions mêmes de leur isolement : chromatographie descendante sur Whatman n° 20 avec acide acétique 5 % pendant 12 heures pour les bandes 4 ou 4*, pendant 12 à 13 heures pour la bande 3, pendant 14 à 16 heures pour les bandes 2 et 1.

Pour les flavonosides moins glycosylés, il est préférable de rechromatographier les premiers éluats sur Whatman n° 1 avec l'acide acétique 5 % ou 10 % pendant 14 à 16 heures afin d'obtenir une migration sur une plus grande distance.

On sépare ainsi le ou les constituants d'une bande donnée des flavonosides présents dans les bandes voisines, mais on ne se débarrasse pas des impuretés non flavoniques qui accompagnent ce constituant et qui possèdent les mêmes caractéristiques chromatographiques que lui. On ne peut pas séparer non plus de cette façon deux flavonosides bâtis exactement sur le même squelette et qui ne diffèrent que par la nature d'un sucre.

2 - Chromatographie descendante sur W_1 avec le solvant de Partridge.

Pour éliminer les impuretés non flavoniques des composés qui ne donnent qu'une seule tache de flavonoïde par chromatographie bidimensionnelle, nous avons souvent utilisé la chromatographie descendante sur Whatman n° 1 avec le solvant de PARTRIDGE (Phase supérieure du mélange butanol 4, acide acétique 1, eau 5), migration sur 30 cm. Après séchage, il faut souvent effectuer, dans le même sens , un deuxième développement du chromatogramme avec l'acide acétique à 5 %, migration sur 32 - 35 cm.

Nous avons pu nous débarrasser ainsi de substances jaunes en U.V. avant $AlCl_3$, ou noirâtres en U. V. après $AlCl_3$, produits de décomposition (?) qui apparaissent quand on chauffe un flavonoside en milieu acide pour étudier son hydrolyse ou son isomérisation et qui empêchent l'étude spectrale.

Ces produits sont solubles dans le méthanol très dilué, dans le méthanol à 80^C ou 90^C, insolubles dans l'acétate d'éthyle, l'acétone... ils présentent pratiquement les mêmes solubilités que les flavonosides dont ils dérivent, et nous n'avons pas réussi à les éliminer en passant nos produits sur des microcolonnes de cellulose, de polyamide, ou de gel de silice.

D'autre part la chromatographie sur papier W_1 avec le mélange de PARTRIDGE comme solvant de migration, est la seule technique qui nous a permis d'éliminer les acides organiques de

type cinnamique qui ont dans l'acide acétique 5 % le même comportement chromatographique que nos flavonosides très glycosylés. En effet, avec le PARTRIDGE , ces flavonosides se déplacent très lentement alors que l'acide organique va vers le fond du solvant.

3 - Chromatographie sur couche mince de gel de silice.

Pour séparer éventuellement les flavonosides qui ne diffèrent que par la nature d'un sucre, et pour éliminer les dernières impuretés d'un composé flavonique reconnu homogène par chromatographie bidimensionnelle, nous avons enfin utilisé une méthode qui nous a été enseignée par le Professeur CHOPIN.

Il s'agit d'une chromatographie sur couche mince de gel de silice H. Merck. Les plaques sont assez difficiles à réussir. Pour 5 plaques 200 X 200 nous mélangeons 35 g de Kieselgel pour CCM Merck avec 80 ml d'eau, en agitant énergiquement 5 minutes. Il faut laisser les plaques sécher à l'air (12 heures environ) ; on active une demi-heure à 110° avant usage.

Comme solvant de migration on utilise un mélange:acétate d'éthyle 80, pyridine 12, méthanol 5, eau 10, qui ne donne qu'une phase. (=A. P. E. M.). On laisse migrer, en principe, à 10 cm. Dans ces conditions les flavonoïdes migrent de façon caractéristique.

Les aglucones s'écrasent au front du solvant.

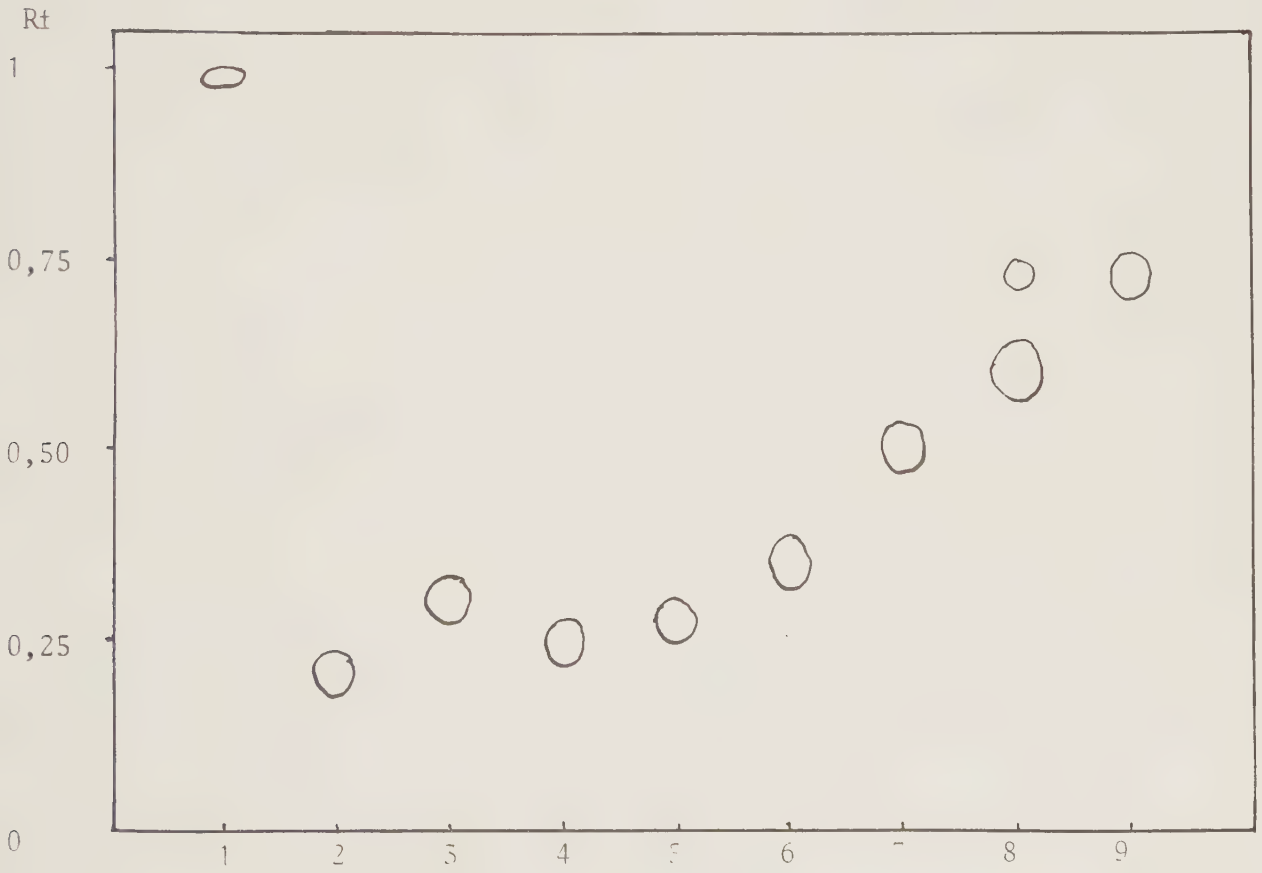
Les mono-C-glycosides ont des Rf compris entre 0,55 (isorientine) et 0,80 (vitexine 0,72 ; isovitexine 0,65). Pour

un aglucone donné le Rf est fonction de la nature et de la position 6 ou 8 de l'ose.

Les di-C-glycosides ont des Rf qui varient entre 0,15 et 0,40, et pour un même aglucone, on observe des différences de migration caractéristiques de la nature des sucres et de leurs positions respectives en C_6 et C_8 (70).

Fig. 19bis : CCM gel si. H. Solv. A. P. E. M.

1 : Apigénine	(1)	6 : Saponarine	(0,36)
2 : Di-C-glucoside citrus	(0,21)	7 : Rhamnosylvitexine	(0,52)
3 : Gluc. 8, Xyl. 6, api.	(0,30)	8 : Saponarine hydrolysée :	
4 : Schaftoside	(0,25)	Vitexine	(0,73)
5 : Violanthine	(0,27)	Isovitexine	(0,61)
		9 : Vitexine	(0,73)



(70) CHOPIN (J.) in WAGNER (H.), HORHAMMER (L.) : Pharmacognosy and phytochemistry, 1971, 111-128.

L'examen de ces différences de migration, dans les mêmes conditions opératoires que celle de CHOPIN, nous ont permis l'étude analytique (par comparaison avec des témoins lorsqu'ils existaient) des flavonosides que nous avons isolés de *Sp. rubra*, ainsi que la détection de produits d'isomérisation ou d'hydrolyse apparus par chauffage en milieu acide.

Par contre, quand nous voulons purifier et isoler nos flavonosides très glycosylés, nous employons un solvant modifié et nous laissons migrer jusqu'à 12 cm environ. Lors de nos premiers essais, en effet, nous n'avons pas pu nous débarrasser totalement de la pyridine éluée avec les flavonosides, et les spectres U. V. obtenus par la suite ne donnaient pas entière satisfaction (pH non correct ?, sel de pyridinium?).La modification apportée consiste essentiellement à remplacer la pyridine par de l'ammoniaque que l'on peut éliminer plus facilement. La présence d'ammoniaque a pour conséquence d'obliger à augmenter la quantité de méthanol pour n'avoir qu'une seule phase.

Nous utilisons le mélange suivant : acétate d'éthyle 80, ammoniaque (en solution concentré à 27 %) 3, eau 20, méthanol q. s. pour avoir une seule phase, en général 23 ml (= A. A. E. M.). La chromatographie doit être faite dans une pièce thermostatée à la température de 18° - 20°C.

Comme le fait l'A. P. E. M., l'A. A. E. M., débarrasse les flavonosides d'impuretés colorées qui restent sur la ligne de départ, et d'autres substances qui migrent un peu plus haut que nos hétérosides très glycosylés ; ces dernières substances qui apparaissent claires en U. V. sans révélation, sont mieux séparées des flavonosides avec l'A. A. E. M.. Les substances flavoniques isolées de *Sp. rubra* et

correspondant à la zone IV de EGGER, qui migrent comme des di-C-flavonosides, sont aussi mieux séparées entre elles dans l'A. A. E. M., mais la différence entre la région de migration des di-C-flavonosides, et celle des mono-C-flavonosides, dimine considérablement, et la zone des di-C-flavonosides ainsi élargie est beaucoup moins caractéristique.

II - METHODES DE CONTROLE DE LA PURETE DES FLAVONOSIDES ISOLES.

L'efficacité des purifications est vérifiée par :

1 - Chromatographie bidimensionnelle sur papier :

1er sens : solvant de PARTRIDGE, migration 35 cm ; témoins : vitexine et échantillon du corps à l'étude.

2e sens : acide acétique 5 % ; migration à front perdu, parallèlement à un témoin de rutoside et à un témoin du composé étudié.

Notre choix s'est arrêté sur ce solvant et non sur l'acide acétique à 15 % utilisé par MABRY (66), Mc. CLURE, ALSTON (71) etc... ou une solution de chlorure de sodium à 3 % comme SEIKEL (72), parceque nous pouvons ainsi contrôler le déplacement des divers composés en comparant avec leur comportement habituel dans les conditions opératoires que nous utilisons le plus fréquemment.

Comme papier nous avons choisi le plus souvent le Whatman n°1 même pour les flavonosides très glycosylés, car

(71) Mc. CLURE (J.W.), ALSTON (R.E.) Amer. J. Bot. 1966, 53 (9), 849-860

(72) SEIKEL (M.) et coll. Phytochem., 1966, 5 , 439-455

ces composés se déplacent fort peu avec le solvant de PARTRIDGE. On révèle soit au chlorure d'aluminium, soit de préférence à l'acétate basique de plomb.

Nous avons parfois utilisé la technique bidimensionnelle avec les mêmes solvants sur plaque de cellulose, car la méthode est plus rapide, mais elle est aussi moins efficace et ne décèle pas les traces d'impureté comme la méthode sur papier.

2 - Chromatographie bidimensionnelle sur plaque de polyamide.

1er sens : solvant 12/4/3/1. Témoin rutoside.

2e sens : solvant de EGGER, dit "apolaire" vu pour les aglucones. Témoin apigénine.

On révèle comme sur le papier avec le chlorure d'aluminium, ou le soluté d'acétate basique de plomb (évaporé et repris dans l'alcool).

Cette technique présente l'avantage de mieux permettre de détecter les acides organiques restant mélangés aux flavonosides.

III - METHODES D'ETUDE DES FLAVONOSIDES PURIFIES.

Les composés flavoniques que nous sommes arrivés à préparer à l'état pur en quantité suffisante, ont été soumis à l'hydrolyse alcaline puis à l'hydrolyse acide.

1) L'hydrolyse alcaline est effectuée à froid, à l'abri de la lumière, sous azote, pendant une douzaine d'heures, dans un milieu réactionnel correspondant à une solution de soude 2N dans le méthanol à 50 %.

L'alcool est ensuite évaporé sous azote, à froid, et la solution aqueuse extraite par l'éther après addition d'acide chlorhydrique en quantité juste suffisante pour que le pH arrive aux environs de 1 à 2. On étudie d'une part l'éther qui contient éventuellement l'acide organique qui estérifiait le flavonoside, et d'autre part la phase aqueuse qui contient le flavonoside désacylé. Une partie de cette phase aqueuse est alors soumise à l'hydrolyse acide.

2) L'hydrolyse acide est réalisée, de façon analogue à celle du lixiviat, en utilisant de l'acide chlorhydrique en quantité telle que le milieu réactionnel corresponde à une solution acide N dans le méthanol à 50 %. On opère sous réfrigérant à reflux à l'ébullition. Dans la mesure où les quantités de produits le permettent, on étudie dans le temps, l'action de l'acide à chaud, en faisant des prélèvements à 5 minutes, 1/4 d'heure, 1/2 heure, 1 heure, 1 heure 30 ou 2 heures (prélèvement maximum), 3 heures, 4 heures, 6 heures, 10 heures. Les prélèvements suffisamment importants sont ensuite évaporés au "Rotavapor", extraits à l'éther en milieu acide puis au butanol.

La phase éthérée, après lavage à l'eau, sert à l'étude des aglucones éventuellement libérés, la phase butanolique sert à rechercher les hétérosides ayant résisté à l'action des acides, la phase aqueuse évaporée, reprise dans la pyridine, sert à caractériser les sucres libérés par hydrolyse.

L'examen des corps apparus par traitement alcalin ou acide des flavonosides, se fait après purification avec les méthodes déjà indiquées.

On procède alors à l'étude parallèle des flavonosides avant et après action de la soude et de l'acide chlorhydrique, avec les mêmes procédés.

1 - Chromatographies comparatives des flavonosides entre eux et, dans la mesure du possible, avec des témoins de produits connus :

- Chromatographie descendante sur papier W_1 ou W_{20} avec l'acide acétique à 5 %, 15 %....
- Chromatographie descendante sur papier W_1 ou W_{20} avec le solvant de PARTRIDGE.
- Chromatographie descendante sur papier W_1 ou W_{20} avec le mélange : butanol 5, éthanol 4, eau 2,2.
- CCM sur cellulose avec l'acide acétique à 2 % ou 15 %.
- CCM sur polyamide avec 12/4/3/1.
- CCM sur gel de silice H

  avec A P E M

  avec mélange acétate d'éthyle 50, butanone 30, acide formique 10, eau 10. (= B. A. F. E.)

2 - Utilisation de réactifs spécifiques pour la révélation des chromatogrammes.

En dehors du chlorure d'aluminium, du chlorure de zirconium, et du carbonate de sodium, qui donnent avec les flavonosides des colorations jaunes peu différentes selon les composés

nous avons utilisé comme réactifs plus spécifiques le soluté d'acétate basique de plomb, et le réactif de BENEDICT , qui permet également de différencier mono et diphénols. La pulvérisation de ce réactif colore en jaune les flavonosides, sous U. V. Cette coloration est avivée pour les monophénols et elle subit une extinction chez les composés orthodiphénoliques. (71) (72) (73)

3 - Examen des spectres U. V. des divers flavonosides avant et après hydrolyse.

L'étude des déplacements des maxima en présence de certains réactifs donnent des indications sur la position des substituants. (66) (74) (75). Néanmoins l'essentiel du spectre est dû à l'aglucone de base ; aussi tous nos produits donnent-ils des spectres peu variés, type apigénine ou type lutéoline.

4 - Autres méthodes spectrales: I. R. Spectre de masse...

L'étude du spectre I. R. n'a donné des résultats positifs que pour un seul de nos produits.

Pour les autres flavonosides isolés de *Sp. rubra*, nous n'avons pas encore de résultats satisfaisants soit

(73) OCKENDON (D.J) et coll., Phytochem., 1966, 5, 601-608.
(74) MABRY (TOM J.) In Perspect. in phytochem., 1969, 1-45
(75) JURD (L.) in GEISSMAN (T.A.) Chem. of flav. compounds., 1962, chap 5, 107-155.

qu'il n'existe pas deproduit de référence de constitution connue auquel notre produit puisse être comparé, soit que nous n'ayons pas encore pu isoler des quantités suffisantes de produit.

Les spectres de masse directs des flavonosides très glycosylés ne peuvent pas non plus donner d'indications précises,car les corps de ce type ne se vaporisent pas, ou très peu, même à une température supérieure à 300°C.

Enfin le seul composé que nous possédons en quantité suffisante pour réaliser un spectre RMN, a pu être identifié sans avoir recours à cette technique car il est identique à un corps synthétique auquel il a pu être comparé.

IV - METHODES UTILISEES POUR L'ETUDE DES OSES.

Les sucres libérés par chauffage des flavonosides en milieu acide, sont étudiés sur la liqueur aqueuse d'hydrolyse débarrassée des aglucones éventuels par l'éther, et des flavonosides résistants à l'hydrolyse par le butanol. La phase aqueuse neutralisée ou non au carbonate de baryum, évaporée, est reprise par la pyridine. On filtre, on évapore à nouveau, et on reprend par le minimum d'eau.

Les sucres sont identifiés par chromatographie en présence de témoins. L'identité des valeurs de Rf n'est pas toujours suffisante, et l'examen des colorations obtenues au moyen de divers réactifs est souvent utile.

La solution contenant les sucres est chromatographiée :

1- sur couche mince de Kieselguhr G,

préparée avec un tampon phosphate à pH 5, selon la technique indiquée par STAHL (57c) ; solvant n. Butanol : 40 - Acétone : 50 - tampon phosphate à pH 5 : 10. On fait migrer sur 10cm. On révèle par le réactif au naphtorésorcinol (100ml d'une solution à 0,2 % de naphtorésorcinol dans l'alcool, mélangée avec 10ml d'acide phosphorique à 85 %). On chauffe 5 à 10 minutes à l'étuve à 100°-105° après pulvérisation du réactif : les sucres se détachent en bleu plus ou moins foncé, bleu-gris, ou bleu violet sur un fond rose violacé.

2- sur papier Whatman n° 1

(on obtient des résultats analogues avec le Whatman n° 4)
Méthode descendante, migration sur 20cm avec divers solvants qui donnent tous de bons résultats. Le temps de migration varie selon le solvant de 2 heures à 12 heures.

a- solvant de Partridge

b- mélange : Acétate d'éthyle 20
Pyridine 10
Eau 20

c- mélange : Butanol 60
Pyridine 40
Eau 30

Sur papier nous révèlons au phtalate d'aniline. (Aniline 0,93g - acide ortho phtalique 1,66g - dissous dans 100ml de n butanol saturé d'eau). Il faut chauffer le chromatogramme pendant 10 minutes à 105° pour que les colorations apparaissent ; on obtient de meilleurs résultats si on attend que le papier soit sec avant de mettre à l'étuve. Les sucres apparaissent en beige-marron, plus ou moins rose-violacé, sur fond beige-jaune clair.

(57c) STAHL. ouvrage cité p. 808, 813, 823, 888.

V - ETUDE DES DIVERS COMPOSES FLAVONIQUES PRESENTS DANS CHACUNE DES BANDES ISOLEES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR W_{20} AVEC AA 5 %.

A - FLAVONOSIDES TRES GLYCOSYLES PRESENTS DANS LA ZONE IV DE EGGER :

1° Corps non hydrolysés par chauffage en milieu acide

BANDE 2 = substance X p. 99

BANDE 1 = substance A p. 111

2° Corps partiellement hydrolysés par chauffage en milieu acide.

BANDE 4 = substance Y p. 122

BANDE 4* = substance Z p. 133

BANDE 3 = substance B p. 137

B - FLAVONOSIDES PEU GLYCOSYLES (zones II et III de EGGER) :

BANDE 03 = substance G p. 122

BANDE 02 = substance K p. 142

BANDE 05 = substance F p. 145

Les autres produits n'ont pu être étudiés car ils n'existent qu'en trop faible quantité dans la drogue.

SUBSTANCE X

On obtient cette substance en purifiant les éluats de la bande 2 par chromatographie répétée sur papier Whatman n° 20 avec l'acide acétique 5 %.

Après avoir vérifié par chromatographie bidimensionnelle sur papier, que le produit obtenu est constitué par un seul flavonoside, on chromatographie sur plaque de gel de Si. H Merck avec l'AAEM comme solvant. On isole sous U. V. la bande jaune sombre de Rf = 0,18 correspondant au composé flavonique. On élue dans une petite colonne, par le méthanol Uvasol Merck à 80°C. On évapore la solution à froid sous azote ou sous vide phosphorique. Il est souvent nécessaire de chromatographier encore une fois sur papier W_{20} avec AA_5, pour éliminer les dernières traces de flavonoside étranger (traces de substance A). Il est indispensable d'utiliser des papiers parfaitement lavés, de charger le chromatogramme au maximum, et d'éluer avec le minimum de solvant en ne considérant comme purifiée que la substance contenue dans les premiers millilitres d'éluat.

Si le produit ainsi isolé est parfaitement pur, on arrive à le faire cristalliser dans le méthanol à 50 % acidifié par une microgoutte d'acide chlorhydrique 2N. Les cristaux du flavonoside pur sont pratiquement blancs.

L'hydrolyse alcaline ne modifie pas la substance X, et le chauffage en milieu acide N ou 2N dans le méthanol à 50 %, n'entraine ni hydrolyse ni isomérisation du flavonoside,

comme le montrent les chromatographies mono et bidimensionnelles effectuées sur le produit avant essai d'hydrolyse acide, et sur le même produit chauffé pendant des temps différents (fig. 20, 21, 22, 23). Néanmoins, au bout de 10 heures de chauffage en milieu acide N, il s'est formé des produits de décomposition, colorés en jaune sous U. V. avant révélation. Ces produits commencent déjà à apparaître après 4 heures de chauffage.

Nous avons isolé la substance X après 2 heures, et 4 heures de chauffage par CCM sur gel de si. H avec A. A. E. M. (= X H^+). Ce produit possède les mêmes caractéristiques spectrales et chromatographiques que la substance originelle ; elle donne les mêmes réactions colorées.

D'ailleurs la substance X isolée des lixiviats hydrolysés de *Spergularia rubra*, est identique à la substance isolée avant hydrolyse de ces lixiviats, et il est beaucoup plus facile de l'obtenir à l'état pur.

Spectres U. V. : La substance X dans le méthanol donne un spectre dont les maxima et les déplacements en présence de divers réactifs (méthylate de sodium, acétate de sodium, acide borique, chlorure d'aluminium seul puis après addition d'acide chlorhydrique) sont à peu près identiques à ceux de la vitexine témoin et à ceux de l'isovitexine indiqués par MABRY (66). (Tableau XV).

On peut en conclure que la substance X est un dérivé de l'apigénine dont tous les groupes phénoliques sont libres.

Les réactions colorées, confirment que la substance X est une flavone ne possédant qu'un seul hydroxyle sur le noyau B :

- réaction de la cyanidine orangée,

Substance X chauffée à 100°
milieu HCl N, méthanol 50 %

CCM = gel Si. H.
Solvant = A. P. E. M.
Révélation = chlorure d'aluminium

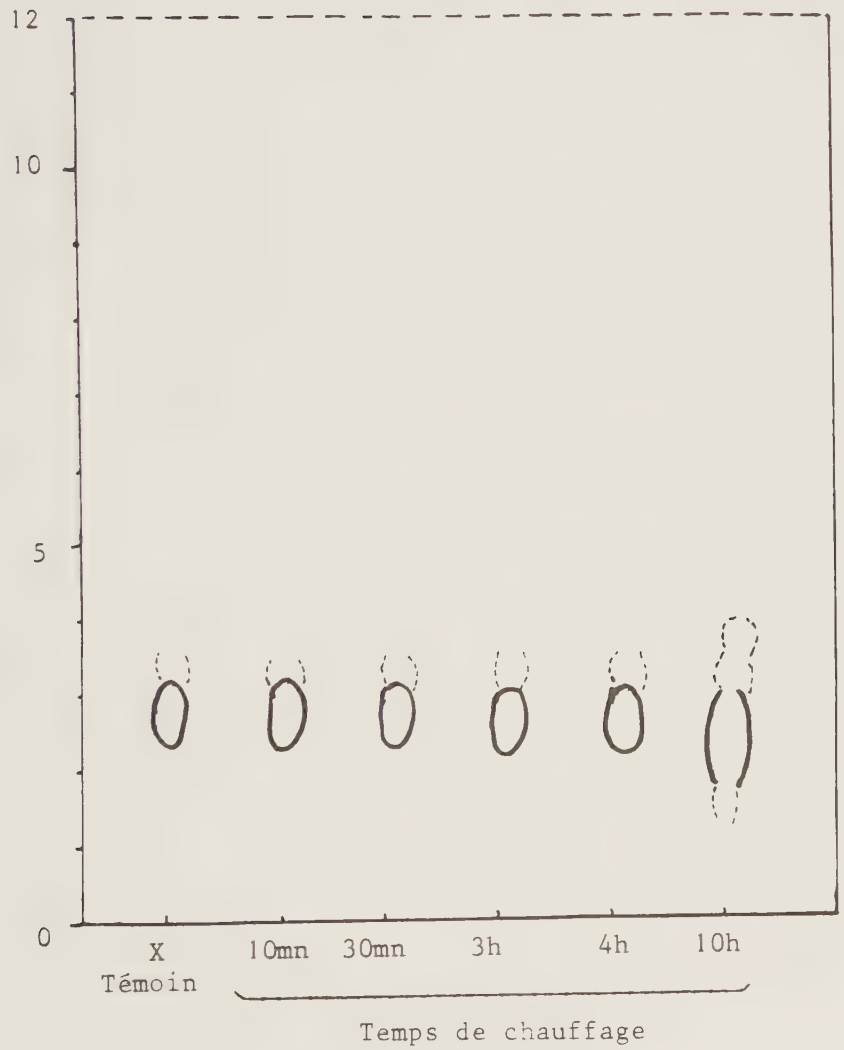


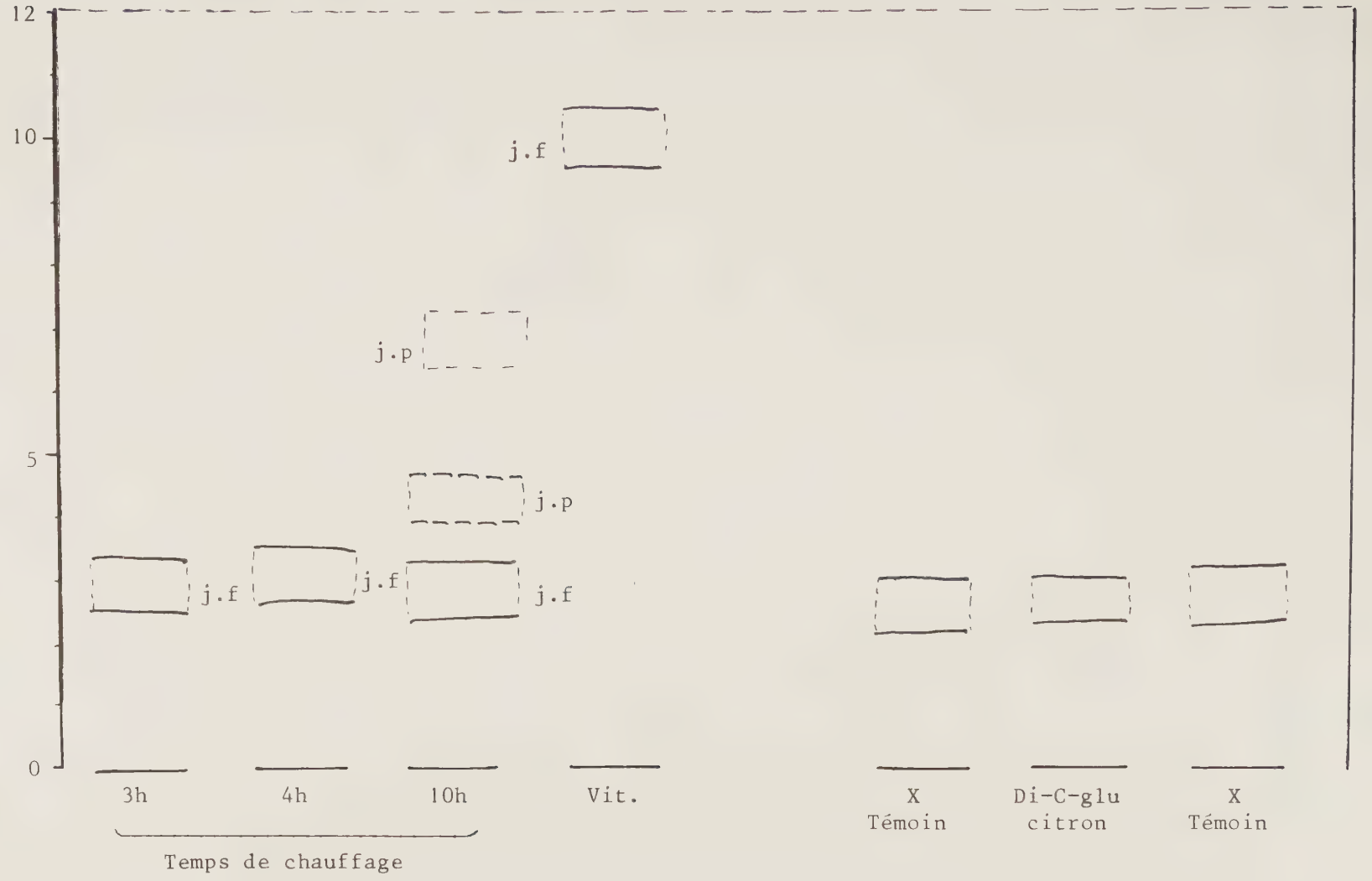
Fig. 20

Fig. 21

Substance X chauffée à 100°
milieu HCl N, méthanol 50 %

Migration comparée de la substance X
et du di-C-glucoside du citron

CCM = gel Si. H. Solvant = A. P. E. M. Révélation = chlorure d'aluminium



j.f = jaune foncé
j.p = jaune pâle sous U. V. sans $AlCl_3$

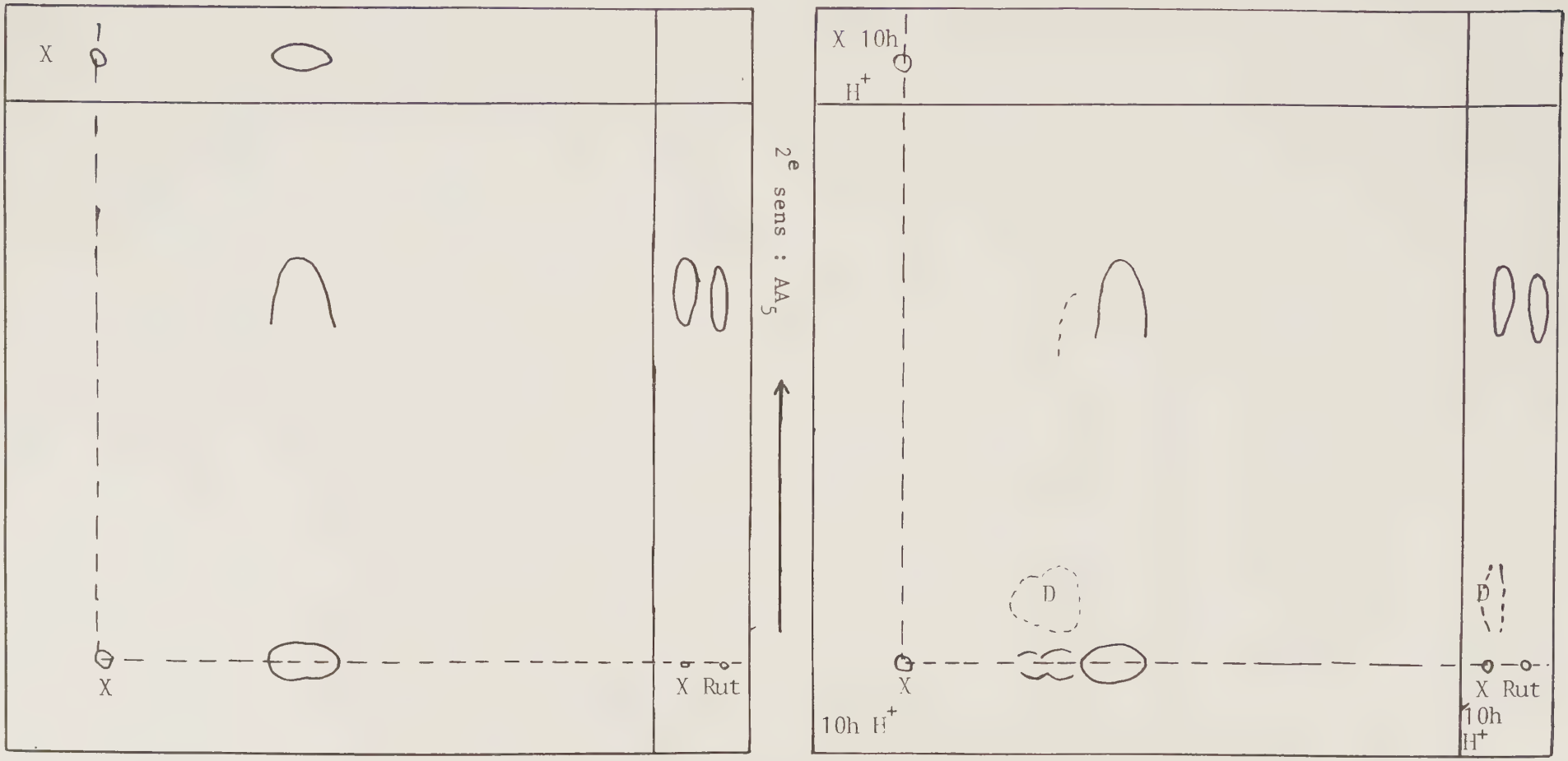
Fig. 22

Vérification de la pureté de X

Fig. 23

et de non isomérisation par chauffage en milieu HCl N, méthanol 50 %. 10h

par chromatographie bidimensionnelle sur W n° 1 . Révélation : $AlCl_3$



D = produits de décomposition jaune clair sous U. V. avant $AlCl_3$

- sous U. V., teinte sombre (brun noir) avant révélation,
- devenant jaune brillant en présence d'acétate basique de plomb,
- jaune vert après pulvérisation du réactif de Bénédict,
- jaune vert par action des vapeurs d'ammoniaque,
- avec le chlorure d'aluminium, la coloration est jaune vif (jaune citron).

Le comportement chromatographique de la substance X indique que ce composé n'est pas l'apigénine et que c'est un hétéroside plus glycosylé qu'un mono-C-glycoside d'apigénine comme la vitexine ou l'isovitexine.

Sur gel de silice H. avec A. A. E. M. , A. P. E. M., ou le mélange butanone - acétate d'éthyle - acide formique - eau, la substance X migre dans la zone des di-C-glycosides.

Rf X = 0,21 sur A. P. E. M.

Sur couche mince de polyamide avec le 12/4/3/1, la substance X possède un Rf = 0,73, correspondant à la région supérieure de la zone IV de EGGER. Ce Rf est voisin de celui du schaftoside de PLOUVIER (Rf = 0,70) et celui de la violanthine de EGGER (Rf = 0,64) qui sont tous deux des di-C-glycosyl-6,8 apigénine. Mais il faut signaler que la saponarine, O glucoside en 7 de la mono-C-glucosyl-C apigénine, (donc diglycoside chez lequel chaque sucre occupe une position différente sur le squelette) migre aussi dans la même zone que les di-C-glycosides. (Rf sap = 0,66)

Sur papier Whatman n° 1 :

- avec le solvant de PARTRIDGE, X se déplace assez peu, (Rf = 0,34) beaucoup moins que la vitexine (Rf = 0,65) (sur papier non lavé).

- avec le BAW 27 %, les migrations sont plus élevées

Rf X = 0,55 Rf vit = 0,74

Notons que sur du papier non lavé les Rf absolus sont nettement moins grands: dans BAW Rf X = 0,32.

- avec l'acide acétique à 5 %, la substance X a un Rf de 0,42, si on laisse migrer sur une trentaine de centimètres. Avec une migration à front perdu pendant 12 heures, le Rf de X par rapport au rutoside est pratiquement égal à 1, les deux flavonosides se déplaçant d'environ 25 - 26 cm (sur papier lavé). Dans les mêmes conditions la vitexine a un Rf rut = 0,38.

Les caractéristiques chromatographiques de la substance X sont rassemblées dans le tableau XVI, comparativement à celles de divers témoins (mono et di-C-glycosides d'apigénine).

Les renseignements fournis par la spectrographie U. V., les réactions colorées et le comportement chromatographique de cette substance qui ne subit ni hydrolyse, ni isomérisation par chauffage en milieu acide, nous permet de dire que nous sommes en présence d'un di-C-glycoside d'apigénine dont les deux sucres fixés en 6 et 8 sont identiques.

La substance X est donc du type vicénine 2, comme celle détectée puis étudiée par SEIKEL (72) chez Vitex lucens où elle n'existe qu'en très petites quantités.

On a trouvé depuis des vicénines 2 chez diverses espèces de plantes ; une première revue en a été faite en 1967, par ALSTON (26). Ces composés diffèrent par la nature du sucre fixé sur les carbones 6 et 8.

L'identification de l'ose par la méthode de dégradation au perchlorure de fer, méthode laborieuse qui nécessite une quantité importante de produit, nous a été épargnée.

En effet, le spectre I. R. de notre substance X est identique à celui de la di-C-glucosyl-6,8 apigénine isolée du citron par CHOPIN (76), et synthétisée ensuite par le même auteur (77) (Figures 24 et 25). Ceci confirme les indications chromatographiques que nous avons résumées dans le tableau XVI et qu'il faut compléter par les expériences suivantes : le mélange de la substance X et du di-C-glucoside du citron, ne se dédouble pas lorsqu'on le chromatographie sur W_1 soit avec une solution de ClNa à 3 %, soit avec le BAW 27 %.

Nous pensons donc pouvoir affirmer que les deux molécules de sucre fixées en C_6 et C_8 sont toutes deux du glucose, et que notre substance X est la

di-C-glucosyl-6,8 apigénine

(76) CHOPIN (J) et coll. C. R. Acad. Sc. Paris, 1964, 259, 13, 3111-3113
(77) CHOPIN (J) et coll. C. R. Acad. Sc. Paris, 1969, 268, 980-982

Ces vérifications ont été faites par Melle M.L BOUILLANT dans le laboratoire du professeur CHOPIN à Lyon. Je ne saurais trop les remercier de l'aide inappréciable qu'ils m'ont apportée, sans laquelle les essais d'identification de mes produits auraient été bien incomplets.

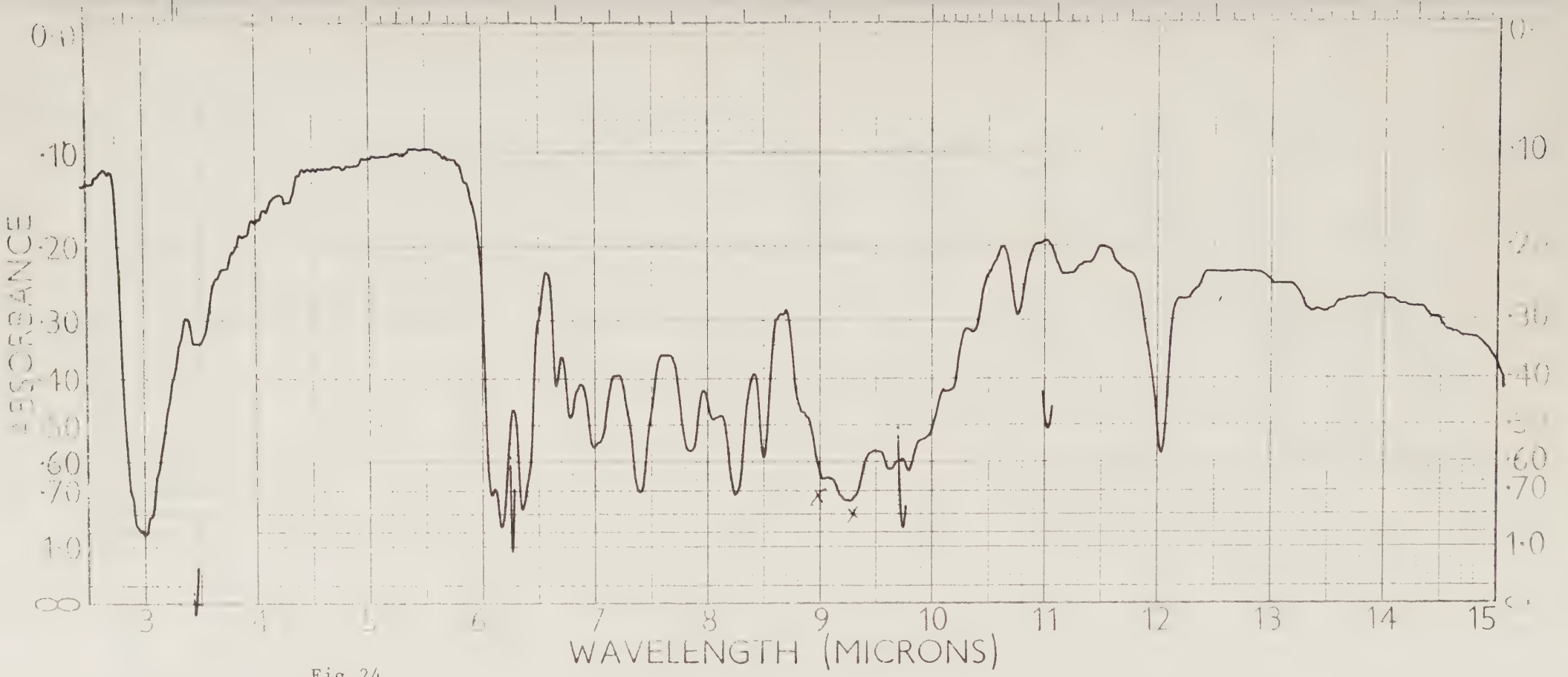


Fig.24

SAMPLE substance X recristallisée dans CH_3OH 50 % H^+	PHASE SOLVENT CONC. CELL PATH	SCAN SPEED fast SLIT OPERATOR M. L. B. DATE 2/12/71 REMARKS pastille KB_2
ORIGIN *Spergularia rubra*	REFERENCE	

- 107 - NO.

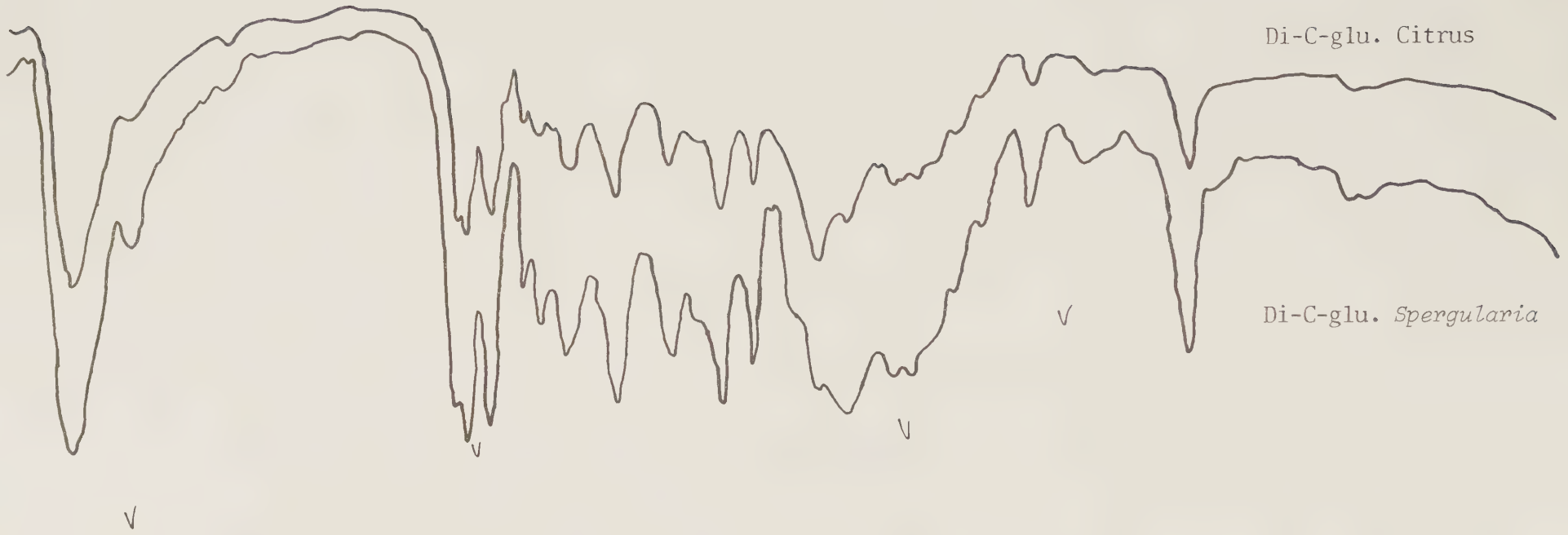


Fig. 25

Comparaison des spectres I. R.
du Di-C-glucosyl.-6,8 apigénine de Citrus limonum
et de la substance Y de *Spergularia rubra*.

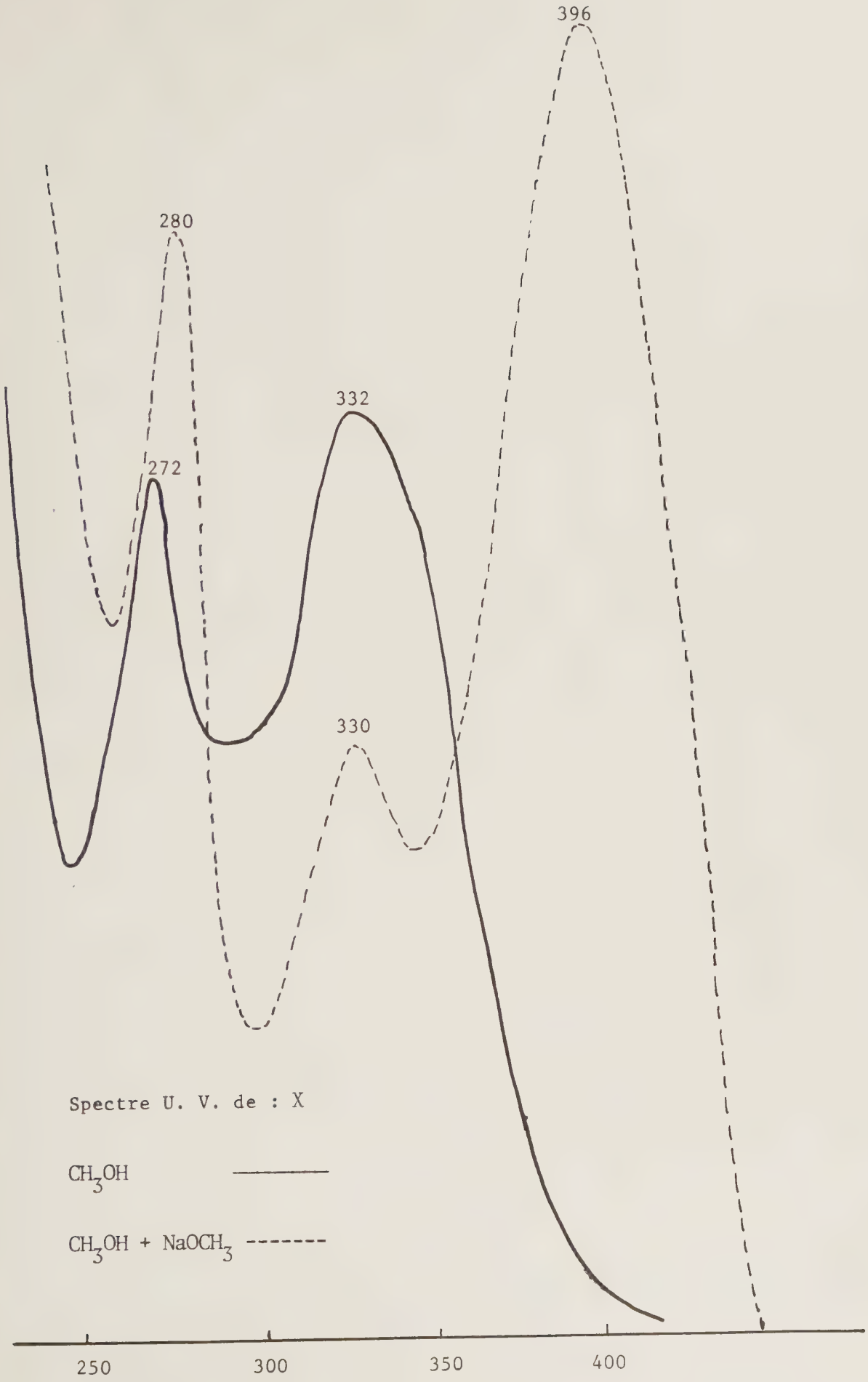
T A B L E A U XV : Comparaison des λmax des spectres U. V. de la substance X, de la substance K et de quelques C-glycosides d'apigénine de référence : Violanthine, Vitexine, Isovitexine.

CH_3OH	Viol.		274	(311)	335		
	X		272		332		
	Vit.		270	(302)	336		
	K		272	(304)	328		
	Isovit.		271		336		
$NaOCH_3$	Viol.		281		333	398	
	X		280		330	396	
	Vit.		279		329	395	
	K						
	Isovit.		278		329	398	
$AlCl_3$	Viol.	(265)	281	307	353	387	
	X	(265)	277	304	350	384	
	Vit.		277	305	350	386	
	K	(264)	278	304	350	384	
	Isovit.	(262)	278	304	352	382	
$AlCl_3$ + HCl	Viol.	(263)	282	306	347	383	
	X	(263)	278	303	343	382	
	Vit.		278	303	343	383	
	K		279	(304)	345	382	
	Isovit.	(260)	280	302	344	380	
CH_3COONa	Viol.		281	(304)	388		
	X		280	(300)	378		
	Vit.		280	300	379		
	K		279	302	378		
	Isovit.		279	303	385		
CH_3COONa + H_3BO_3	Viol.	274			(330) 348	(412)	
	X						
	Vit.	271			(329) 344		
	K	271			330		
	Isovit.	274			346	(408)	

T A B L E A U XVI :

Rf de la substance X comparés avec ceux de mono-C et de di-C glycosyl apigénine de référence.

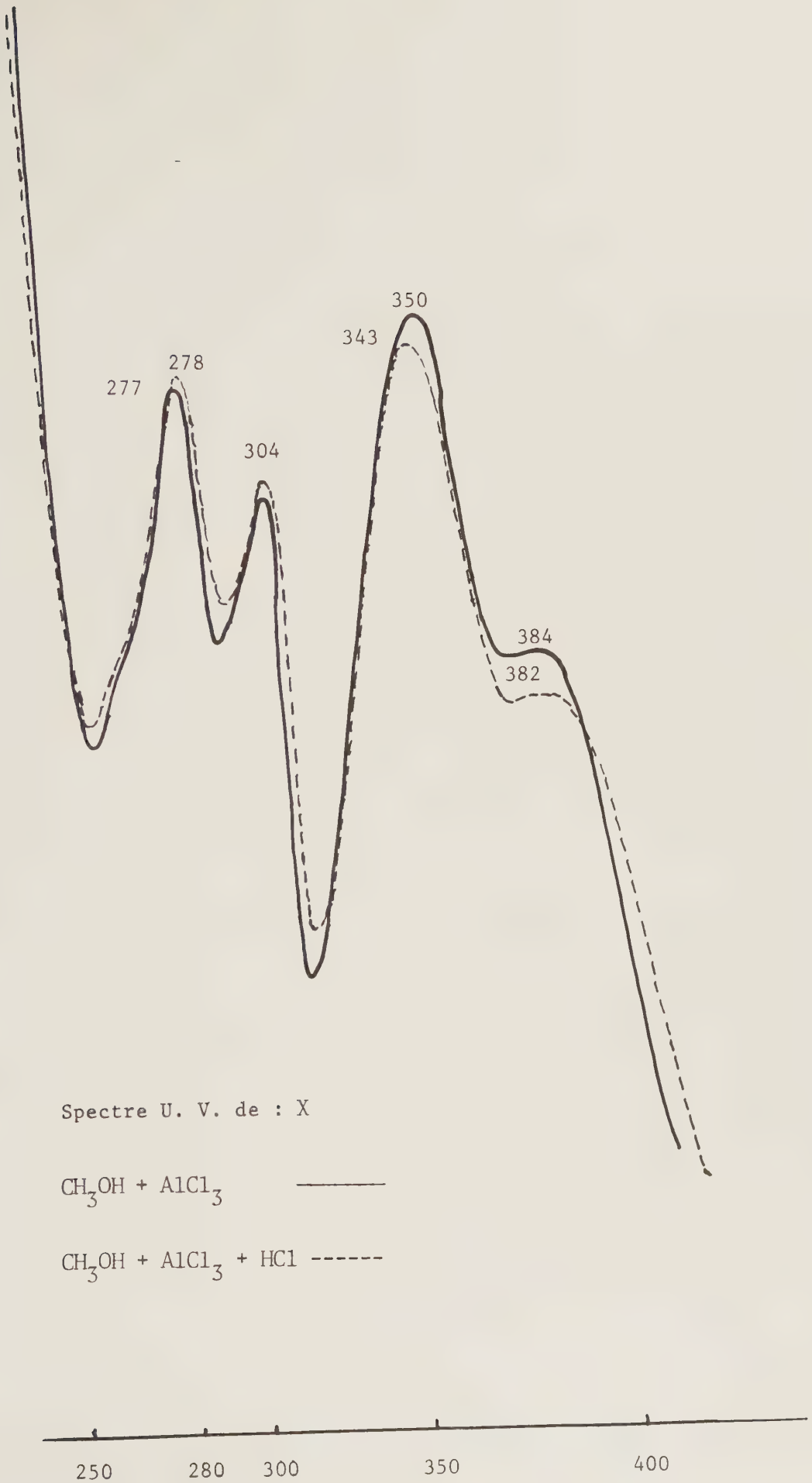
		Rf diglycosides < Rf monoglyc.			Rf diglycosides > Rf monoglyc.		
		CM gel si. H		W_1	CCM polyamide 12/4/3/1	W_{20}	CCM cellulose
		APEM	AAEM	Partridge		AA_5 Rf rut.	AA_5
di-C-glycosyl apigénine	Schaftoside PLOUVIER	0,25	0,27		0,70	1,12	
	Di-glucoside citrus CHOPIN	0,21	0,20	0,33			0,34
	Violanthine EGGER				0,64		
X		0,21	0,20	0,34	0,73	1,05	0,34
mono-C glycosyl apigénine	Vitexine	0,74	0,84	0,52	0,34	0,38	0,11
	Isovitexine	0,62	0,71		0,24		



Spectre U. V. de : X

CH_3OH ————

$CH_3OH + NaOCH_3$ -------



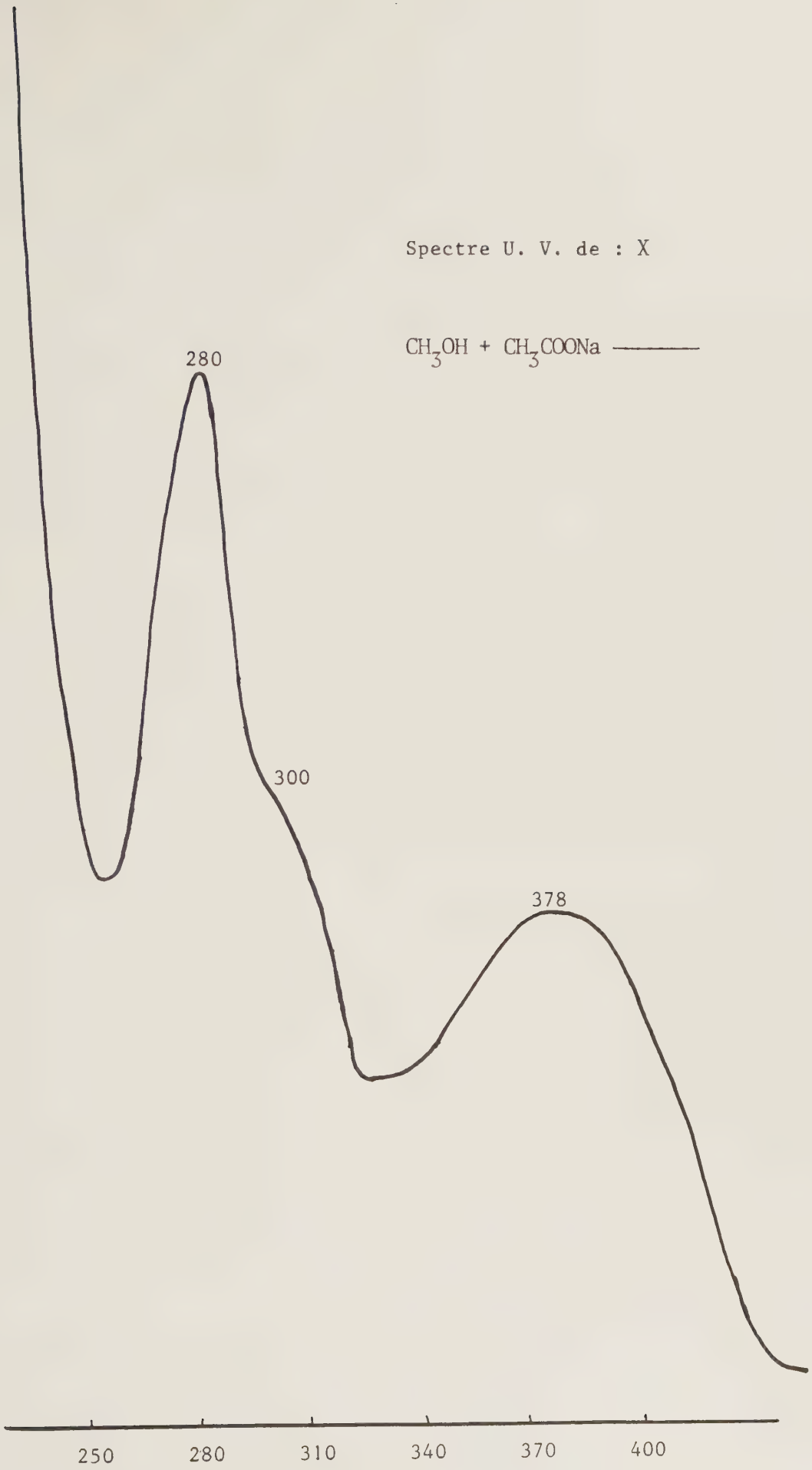
Spectre U. V. de : X

$CH_3OH + AlCl_3$ ————

$CH_3OH + AlCl_3 + HCl$ ------

Spectre U. V. de : X

CH_3OH + CH_3COONa ————



SUBSTANCE A

Les solutions hydroalcooliques fournies par l'élution de la bande 1 obtenue sur W_{20} avec AA_5, contiennent un flavonoside particulièrement sensible à l'oxydation, facilement décomposé par les impuretés métalliques des réactifs, rapidement altéré par chauffage.

Si le papier utilisé pour les séparations chromatographiques n'a pas été soigneusement lavé à l'EDTA puis à l'eau, et enfin à l'alcool, le résidu d'évaporation des éluats est noirâtre, ou noir verdâtre ; l'addition de quelques gouttes d'une solution d'EDTA donne à nouveau une solution jaune-clair, mais la solution ainsi traitée ne peut plus être utilisée pour l'isolement du flavonoside.

La purification de la substance A est donc délicate car les solutions contenant ce composé flavonique devraient être évaporées à froid sous azote ou sous vide phosphorique, et à l'abri de la lumière pour donner, sans trop de perte, un produit convenable. Il est impossible d'opérer de cette façon lors de l'isolement de la substance, car les volumes de solvants mis en oeuvre sont trop importants, mais il est indispensable de prendre toutes ces précautions dès qu'on en arrive au stade de la purification.

Nous purifions la substance A par chromatographies répétées sur W_{20} avec AA_5 (migration 16 heures minimum) puis par chromatographie avec le même solvant sur W_1 pendant 12 heures. Il est très difficile de débarrasser ainsi totalement la

substance A des autres flavonosides de la zone IV de EGGER. Ces corps ne peuvent pas non plus être éliminés par chromatographie avec le Partridge, car tous les hétérosides très glycosylés présents chez *Spergularia rubra*, se déplacent très peu dans ce solvant. Le BAW 27 % donnerait de meilleurs résultats.

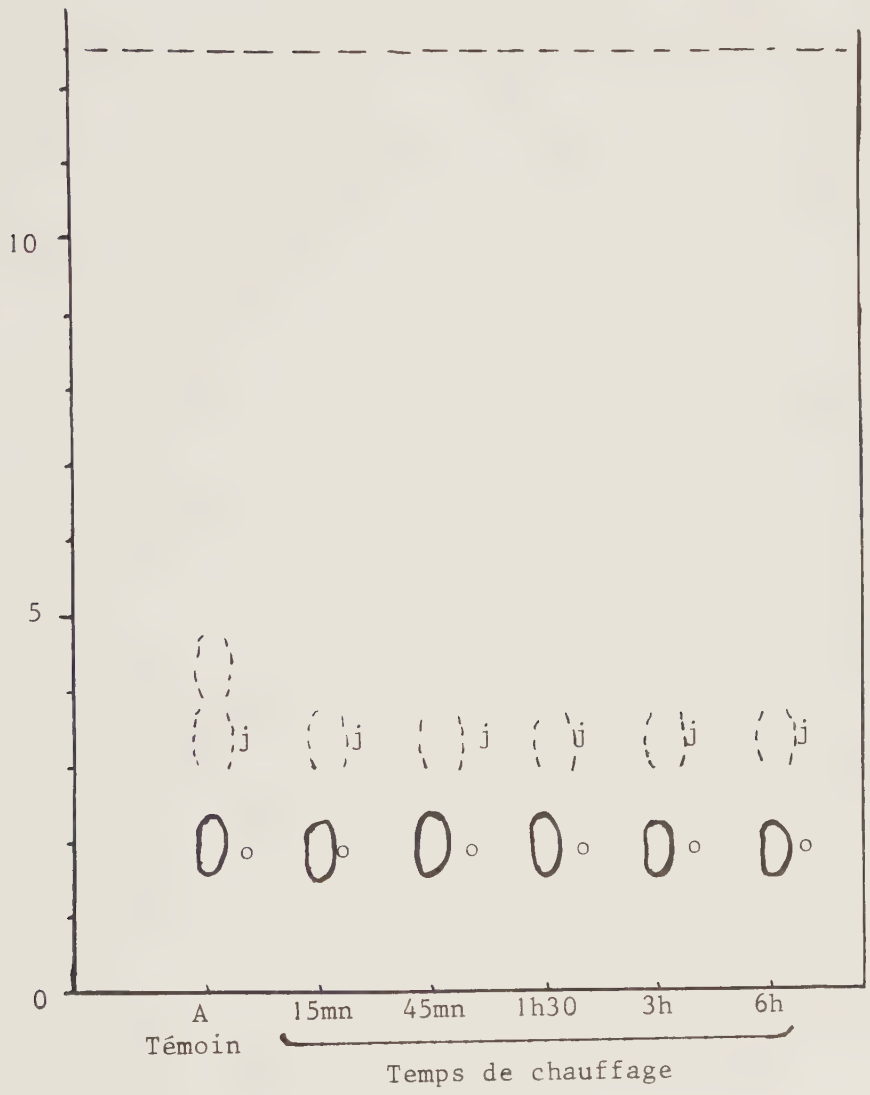
Après les repurifications que nous avons fait subir récemment à la substance A, celle-ci, par chromatographie bidimensionnelle sur papier et révélation à l'acétate de plomb, ne laisse apparaître qu'une seule tache colorée en orangé-rouge, (Rf_{rut} = 0,17 Partridge/0,81 AA_5) mais on décèle encore des petites traces de deux dérivés de l'apigénine colorés en jaune par l'acétate de plomb ; les Rf de l'un de ces corps correspondent à ceux de notre substance X.

Le chauffage à l'ébullition, en solution hydroalcoolique acide N, ne provoque pas l'isomérisation de la substance A. Comme le montrent les figures 26 , 27 et 28 reproduisant les chromatographies mono et bidimensionnelles effectuées sur les solutions de A chauffées pendant des temps différents, il n'apparait pas d'autre tache colorée en orangé. Par contre on voit, surtout après 6 heures de chauffage, des produits de décomposition présentant une fluorescence jaune en U. V. même avant action du chlorure d'aluminium.

Après avoir éliminé ces produits de décomposition en faisant migrer, déjà sur W_1 avec le solvant de PARTRIDGE, puis en effectuant après séchage, une deuxième migration dans le même sens avec l'acide acétique à 5 %, on obtient un flavonoside (AH) qui possède les mêmes caractéristiques spectrales et

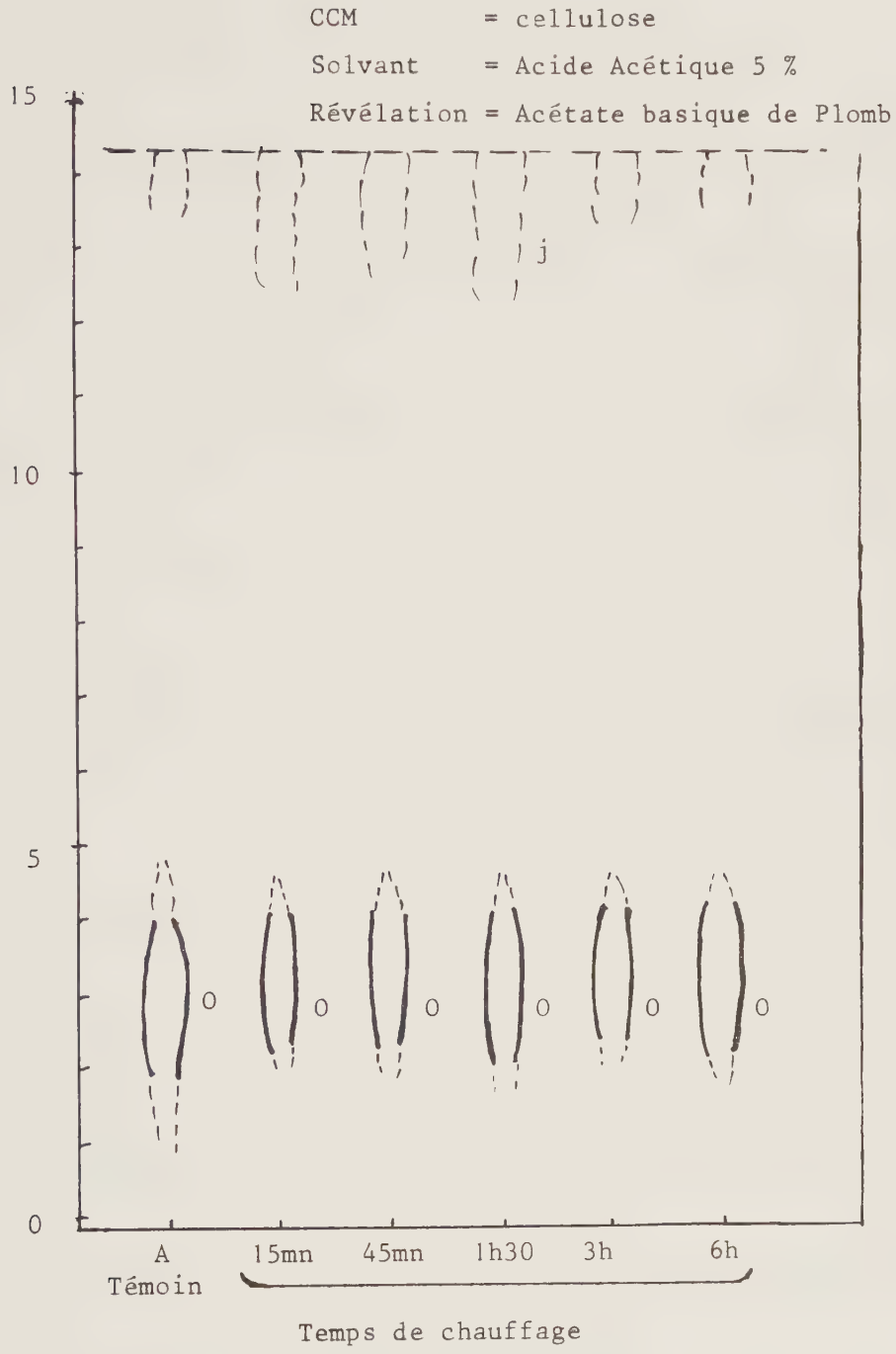
Fig.26 Substance A chauffée à 100°
milieu HCl 2N,méthanol 50 %

CCM = gel Si. H.
Solvant = A. P. E. M.
Révélation = Acétate basique de Plomb



o = tache orangée
j = tache jaune-pâle

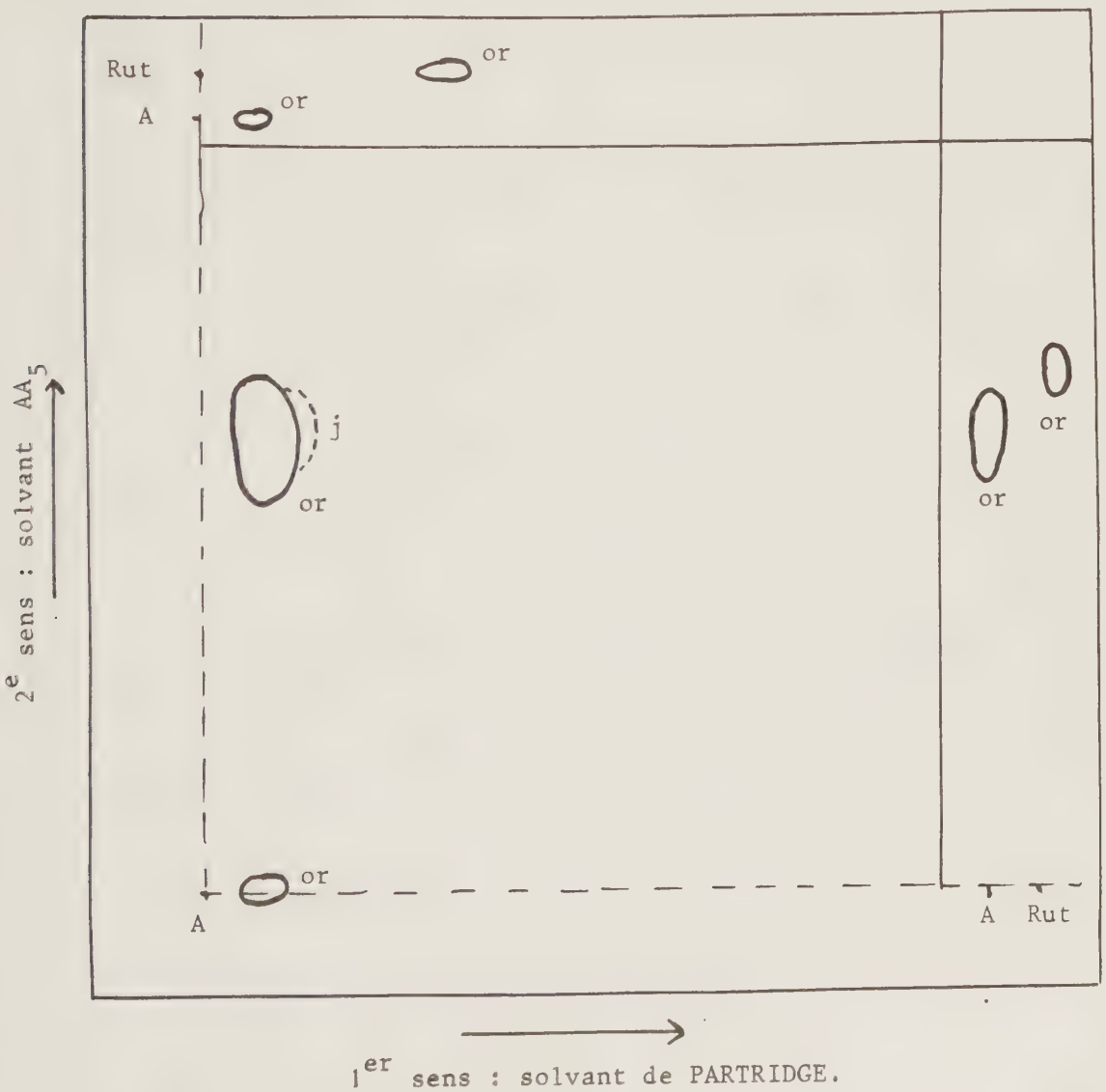
Fig. 27 Substance A chauffée à 100°
milieu HCl 2N, méthanol 50 %



O = tache orangée
j = tache jaune-pâle

Fig. 28

Vérification de la non isomérisation de la
substance A chauffée 3 heures à l'ébullition
en milieu HCl N, méthanol 50 %
par chromatographie bidimentionnelle sur papier W n° 1.
Révélation : Acétate basique de plomb



chromatographiques que la substance A et qui donne les mêmes réactions colorées. D'ailleurs, on obtient la même substance A à partir des lixiviats non hydrolysés et des lixiviats hydrolysés où elle existe en bien plus forte proportion.

Comportement chromatographique :

La substance A migre sur gel de silice H, avec l'A. P. E. M. ou avec le mélange : acétate d'éthyle-butanone-acide formique-eau, dans la zone des di-C-glycosides, comme le montre le tableau suivant.

T A B L E A U XVII: Rf de la substance A comparés à ceux de di-C et de mono-C-glycoside témoins.

	CCM gel sil. H	A P E M	B A F E
	substance A	0,16	0,17
Di-C-glycosides	Schaftoside	0,25	0,27
	substance X	0,21	0,20
	Di-Glucosyl.-6,8, apigénine	0,21	0,20
mono-C-glycosides	Vitexine	0,75	0,84
	Isovitexine	0,71	0,61
	Isoorientine	0,45	

La substance A migre peu dans le solvant de PARTRIDGE, aussi bien sur Whatman n° 1 (Rf rut. 0,22) que sur Whatman n° 20 (Rf rut. 0,10).

Par contre son Rf est élevé sur C. M. de polyamide avec le 12/4/3/1 ainsi que sur papier avec les solvants aqueux.

T A B L E A U XVIII :

Rf rut.	A	X	Schaft
W_{20} AA_5	0,78	1,08	1,1
W_1 AA_5	0,74	1,06	
W_1 AA_{15}	0,85	0,90	

Ces Rf confirment qu'il s'agit d'un hétéroside et qu'il est fortement glycosylé.

Réactions colorées :

La réaction de la cyanidine est positive. La teinte est orangée.

Avec le chlorure d'aluminium la coloration est jaune soutenu, assez foncé.

Avec l'acétate basique de plomb, la coloration est orangé-rouge, d'autant plus rouge que la substance est plus pure.

La tache jaune clair obtenue avec le réactif de BENEDICT devient sombre quand on l'examine sous U. V.

Ces tests indiquent que ce composé est une flavone possédant un groupe orthodihydroxylé en 3' - 4'.

Le spectre U. V., dans le méthanol, de la substance A ayant subi ou non le chauffage en milieu acide, présente les mêmes maxima que les spectres U. V. de l'orientine, de l'isoorientine et de la lutéoline ce qui indique que ce composé possède un squelette de tétrahydroxy-3', 4', 5, 7-flavone. Les déplacements spectraux en présence de méthylate de sodium, d'acétate de sodium, d'acide borique, de chlorure d'aluminium, avant et après addition d'acide chlorhydrique, sont aussi très comparables à ceux des corps précédents, ce qui indique que les groupes hydroxyles en 3', 4', 5 et 7 sont tous libres. (Tableau XIX).

De plus, il n'y a pas seulement ressemblance, mais identité parfaite, entre les spectres U. V. de la substance A et ceux reproduits par MABRY (66) pour la lucénine 1. (Tableau XIX).

D'après SEIKEL (72) qui a isolé le produit et qui l'a étudié, la lucénine 1 est une di-C-glycosyl-6,8-lutéoline dont les deux sucres sont différents. Contrairement à notre produit la lucénine 1 s'isomérise par chauffage en milieu acide.

D'ailleurs les chromatographies effectuées en présence d'un témoin de lucénine 1 pure et d'un témoin contenant à la fois les 3 lucénines de SEIKEL en mélange, sur W_1 avec le BAW 27 %, ainsi que les chromatographies réalisées avec un témoin interne de lucénine 1 sur W_1 avec une solution de chlorure de sodium à 3 %, montrent que la substance A n'est ni la lucénine 1 ni la lucénine 3 de Vitex lucens. (Fig.29 et 30)

T A B L E A U XIX :

Comparaison des max. des spectres U. V.

de la Lucénine$_1$, de la substance A,

de la substance F, et de l'isoorientine.

CH_3OH	Lucénine 1		257	272		349	
	Substance A		258	272		349	
	Substance F		255	270		346	
	Isoorientine	(242)	255	271		349	
$NaOCH_3$	Lucénine 1	(240)	266	280	(344)	408	
	Substance A	(244)	267	280	(344)	408	
	Substance F						
	Isoorientine		267	(278)	(337)	406	
$AlCl_3$	Lucénine 1		280	(303)	332	430	
	Substance A		278	(301)	(334)	428	
	Substance F		276	(302)	(330)	426	
	Isoorientine		278	(302)	332	429	
$AlCl_3$ + HCl	Lucénine 1	(265)	278	(297)	359	(384)	
	Substance A	(265)	278	(296)	359	(385)	
	Substance F	256	276	(298)	361	(386)	
	Isoorientine	(265)	279	(296)	361	(384)	
CH_3COONa	Lucénine 1	(271)	282		326	398	
	Substance A	(271)	282		328	398	
	Substance F		278		324	396	
	Isoorientine		276		323	393	
CH_3COONa + H_3BO_3	Lucénine 1	266	(287)		382	430	
	Substance A	268	(286)		386	428	
	Substance F						
	Isoorientine	265			377	429	

N. B. Les chiffres entre parenthèse indiquent les inflexions.

Les max. pour isoorientine et lucénine 1 sont celles indiquées par MABRY (66).

Solvant : B. A. W. 27 %

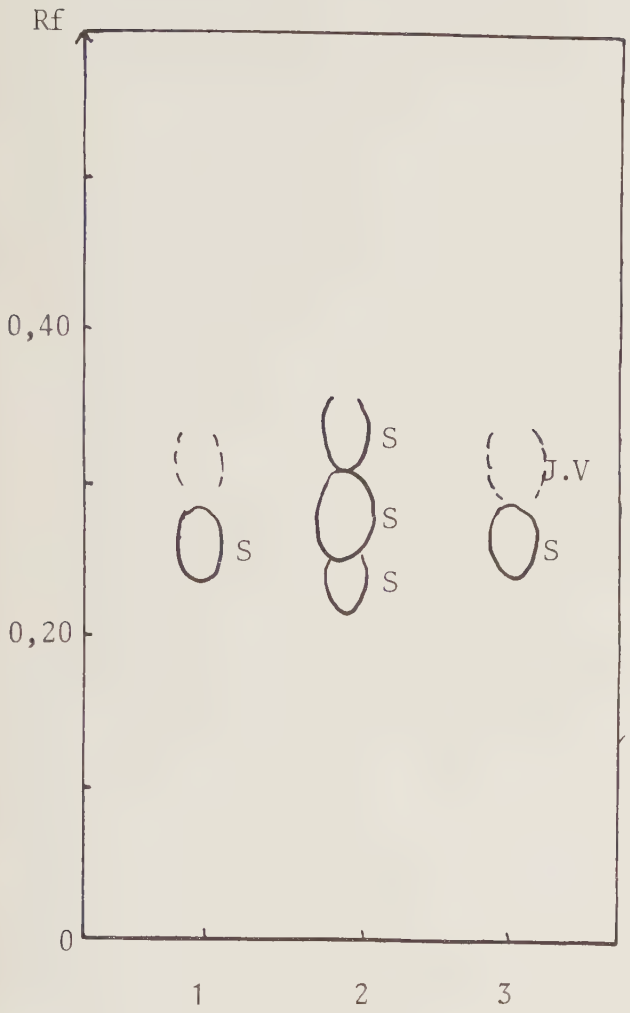


Fig. : 29

Solvant : ClNa 3 %

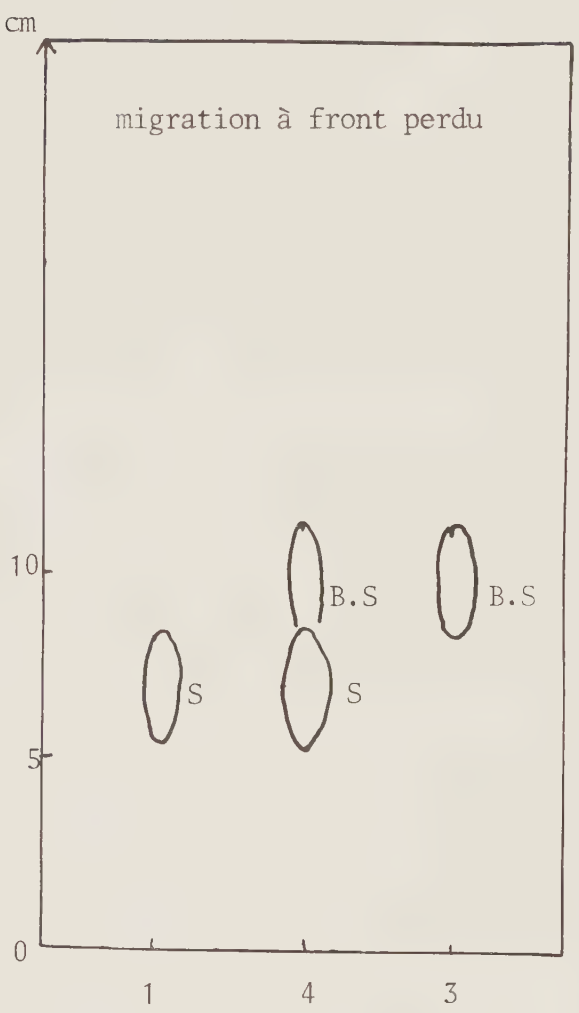


Fig. : 30

Chromatographies descendantes sur W n°1

Dépôt n° 1 = Lucénine$_1$ naturelle

n° 2 = Lucénines de Vitex lucens en mélange

n° 3 = Substance A

n° 4 = Substance A + Lucénine$_1$

Révélation par le réactif de Bénédict :

S = taches sombres (noires) (3'-4' diphénol.)

J.V = Jaune vert (4' monophénol.)

B.S = Brun sombre (mélange...)

Ceci est confirmé par l'examen des spectres I. R.. Le spectre I. R. de la substance A ne correspond ni à celui de la lucénine 1 ni à celui de la lucénine 3 synthétisées par CHOPIN. Il n'a pas pu être comparé à celui de la lucénine 2 dont la synthèse n'a pas encore été réalisée.

Le spectre I. R. de la substance A a été fait sur un produit moins pur que celui que nous possédons actuellement ; il permet cependant d'affirmer que la substance A est un di-C-glycoside et qu'il n'est identique ni à la lucénine 1, ni à la lucénine 3,synthétiques.

Le spectre I. R. de la substance A n'a pas pu être comparé à celui de la lucénine 2 dont la synthèse n'a pas encore été réalisée, et dont il n'existe pas d'échantillon de référence (78) à cause des difficultés d'isolement et de purification déjà signalées par SEIKEL (72).

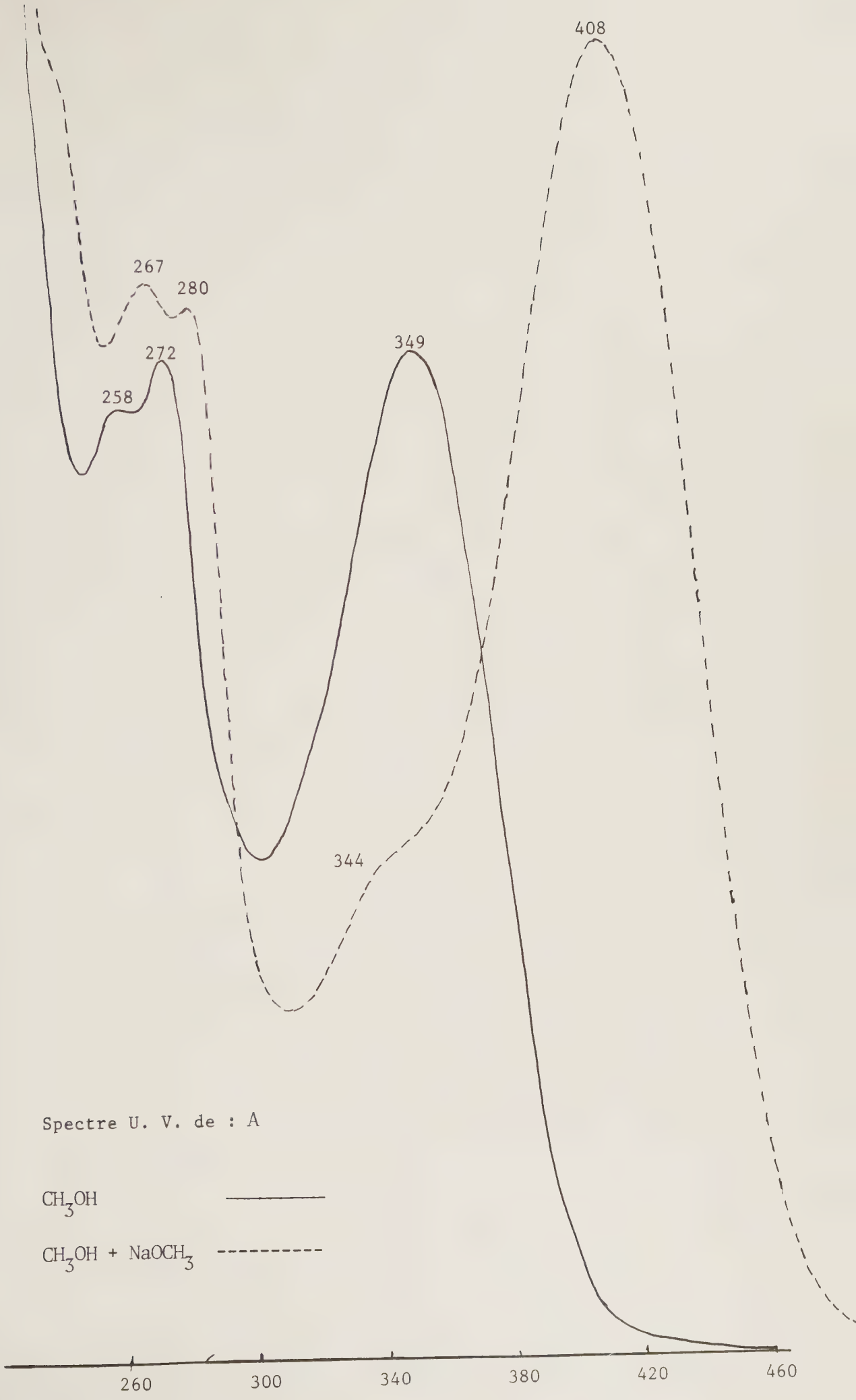
Compte tenu de l'absence apparente d'isomération de la substance A par chauffage en milieu acide, et de la comparaison des Rf sur W_1 avec BAW 27 % et sur W_1 avec ClNa 3 %, on peut penser que ce flavonoside est

une lucénine symétrique, type lucénine 2 de SEIKEL.

On ne sait rien sur la nature des oses fixés sur les carbones 6 et 8.

Nous poursuivons l'isolement et la purification de ce composé afin de pouvoir faire des études de structure plus poussées.

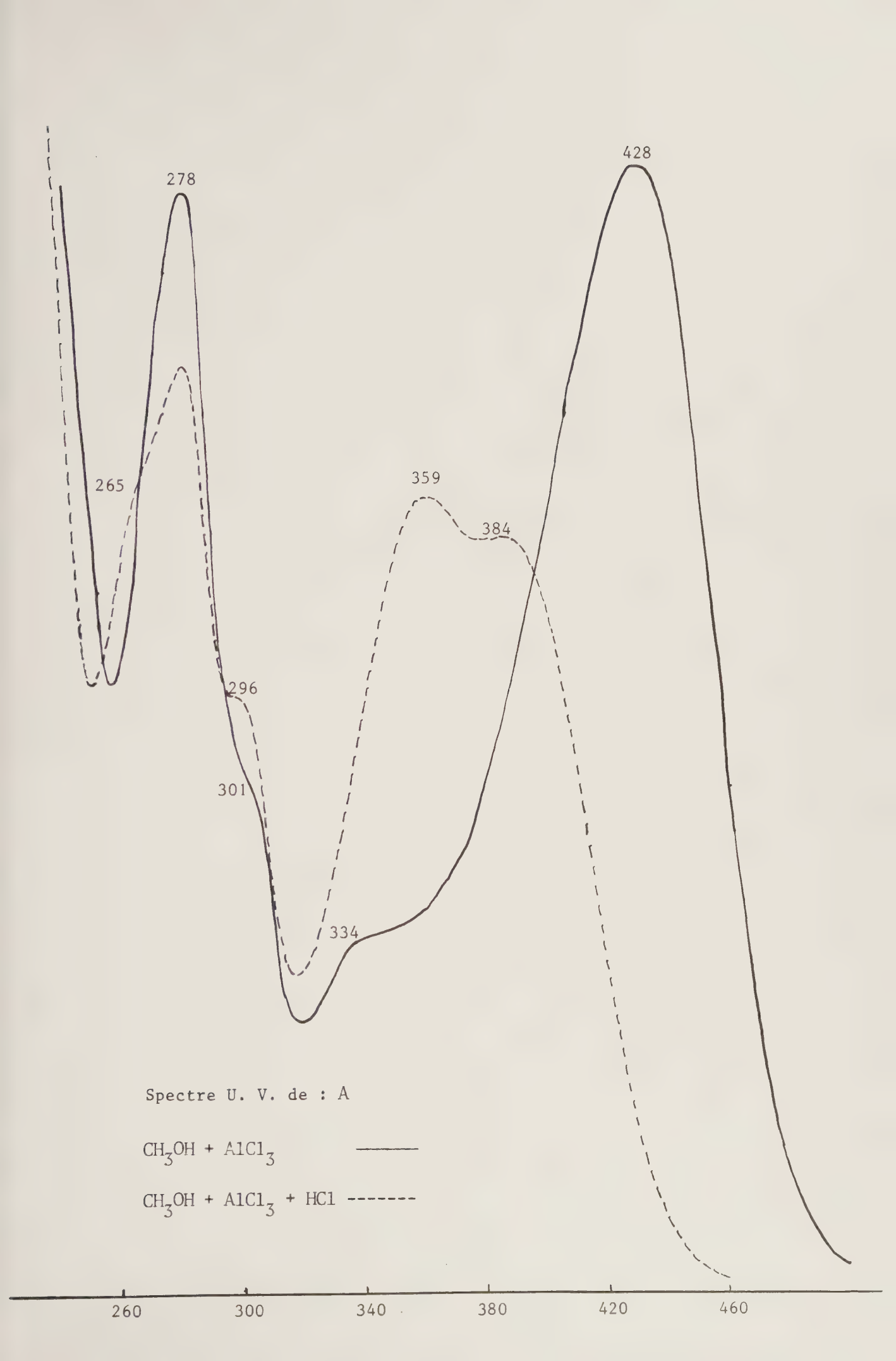
(78) KROSCHEWSKY (J.R.) et coll. Phytochem.,1969, 8, 1495-1498

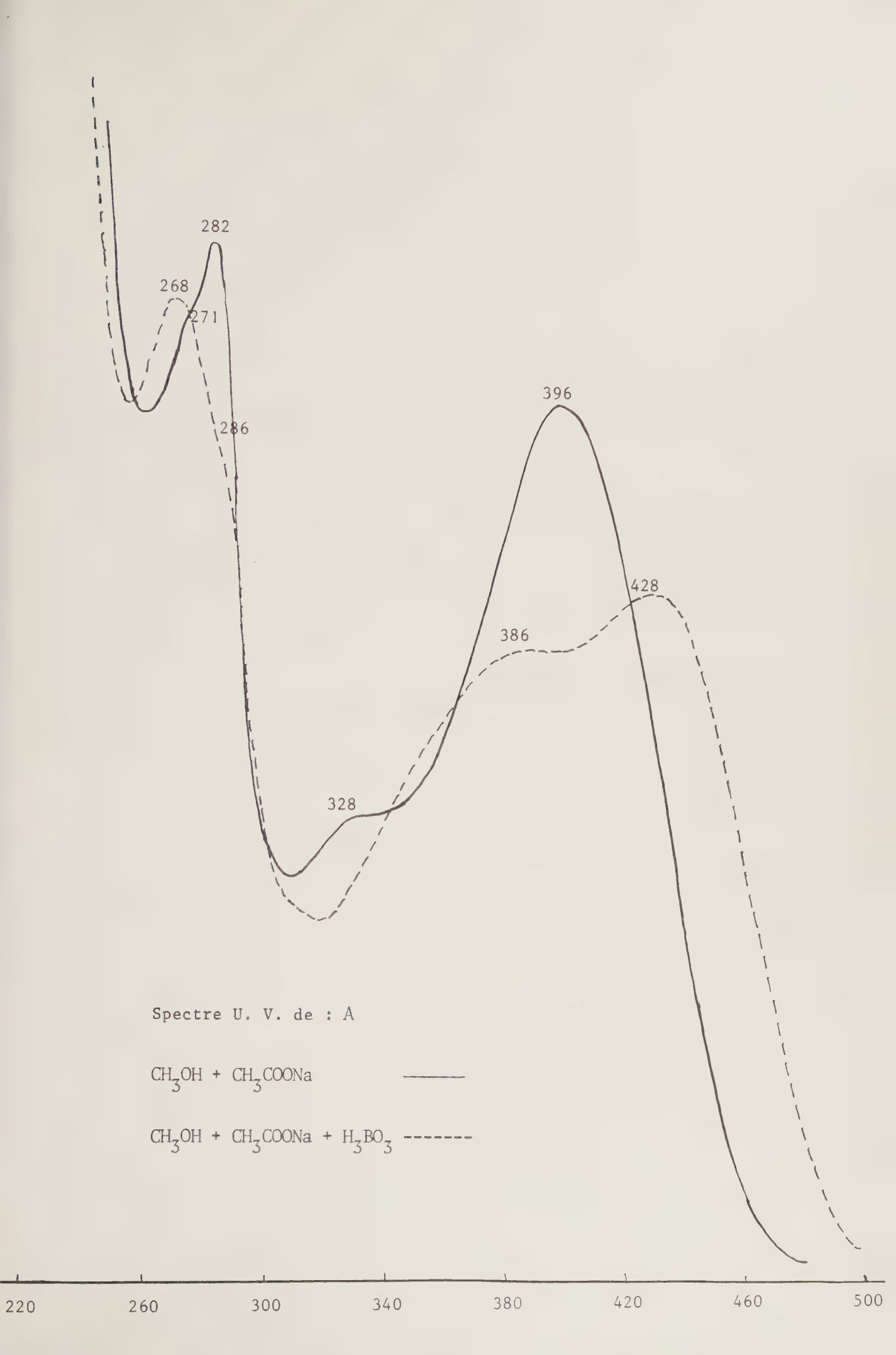


Spectre U. V. de : A

CH_3OH ——————

$CH_3OH + NaOCH_3$ ----------


428
278
265
359
384
296
301
334
Spectre U. V. de : A
$CH_3OH + AlCl_3$
$CH_3OH + AlCl_3 + HCl$
260
300
340
380
420
460


282
268
271
286
396
428
386
328
Spectre U. V. de : A
CH3OH + CH3COONa
CH3OH + CH3COONa + H3BO3
220
260
300
340
380
420
460
500

S U B S T A N C E S Y E T G

La bande 4 éluée dans le méthanol à 80°, est rechromatographiée à plusieurs reprises dans les conditions qui ont servi à son isolement (W_{20} - AA_5 - 12 h).

Quand le produit est homogène en chromatographie bidimensionnelle sur papier, on élimine les impuretés non flavoniques résiduelles en isolant le produit par CCM sur gel si. H avec A. A. E. M.

Les bandes correspondant au flavonoside pur, détectés sous U. V., sont grattées ; la poudre mise dans une microcolonne est éluée par le méthanol pour spectroscopie à 80° ; on évapore l'éluat à froid sous azote ou sous vide phosphorique ; on obtient : la substance Y.

Ce composé flavonique migre dans la zone des di-C-glycosides sur gel de si. H avec A. P. E. M. (Rf : 0,22) comme le schaftoside de (Rf : 0,25) la di-C-glucoside apigénine du citron (Rf : 0,21) ou notre substance X (Rf : 0,21).

La substance Y possède en U. V. avant révélation, une couleur jaune-clair comparable à celle de la saponarine témoin, et différente de la couleur jaune très foncé des di-C-flavonosides témoins. Mais le Rf de la saponarine (Rf : 0,36) est plus élevé

que celui de la substance Y. Plus élevé également dans ces mêmes conditions est le Rf de la "Rhamnosido-vitexine" (Rf : 0,52).

La substance Y est révélée en jaune vif par le chlorure d'aluminium, et par l'acétate basique de plomb. Elle se colore en jaune par pulvérisation avec le réactif de Bénédict ; et sous U. V. présente alors une fluorescence jaune clair. (= pas de groupe orthodiphénolique libre en 3' - 4'.)

Son spectre U. V. est du type apigénine max. dans CH_3OH : 272 nm et 334 nm, avec dédoublement des pics après action du chlorure d'aluminium. Le spectre du chélate reste inchangé après addition d'acide, ce qui confirme l'absence de groupe orthodiphénolique en 3' -4'.

Le tableau XX donne les Rf de la substance Y, de la saponarine, et de la rhamnosylvitexine, obtenus dans des conditions identiques. On voit que Y et la saponarine sont très proches l'une de l'autre, et différentes de la rhamnosylvitexine.

Ce produit qui nous a été aimablement fourni par le Docteur IVERNI de Milan, comme la 4' rhamonosido-vitexine, nous semble être, d'après son comportement en U. V. avec les divers réactifs, la 2" O-rhamnosylvitexine. Son Rf sur gel si. H avec APEM et BAFE confirme cette hypothèse.

Tableau - XX - Rf (±0,02) comparés de la substance Y , de la Saponarine et de la Rhamnosylvitexine.

	Substance Y	Conditions de chromatographie	Saponarine	Rhamnosyl-Vitexine
		aglucone restant sur la ligne de départ ou migrant peu.		
Rf rut	1,51	W2O - A A 5	1,31	1,52
-	1,19	- A A 15		
Rf	0,62	CCM cellulose AA 2	0,60	
-	0,77	- AA 15	0,74	
-	0,75	CCM polyamide 12/4/31	0,67	0,55
		aglucones migrant plus haut que Y et que Saponarine		
Rf	0,59	W_1 - Butanol AA 27 % aa		
Rf	0,13	W_{20} Partridge		
-	0,35	W_1 Partridge	0,43	
-	0,12	W_{20} Butanol Ethanol H_2O	0,19	
-	0,22	CCM gel si.H,A.P.E.M.	0,36	0,52
-	0,27	- A A E M		
-	0,15	- B A F E	0,27	0,54

Les essais d'hydrolyse en milieu alcalin n'apportent aucun changement dans les spectres U. V. ni dans le comportement chromatographique de la substance Y.

Par contre, le chauffage en milieu acide, donne naissance à un ose et à au moins deux flavonosides différents de Y, qui migrent dans la zone des mono-C-glycosides sur gel de silice H. avec l'A. P. E. M. (Rf : 0,81 et 0,75).

Le plus important (en quantité) des deux flavonosides apparus après 1 heure 30 d'hydrolyse chlorhydrique, présente les mêmes caractéristiques chromatographiques et spectrales que celles de la substance constituant la bande 03 (= substance G.), substance isolée avant et après hydrolyse acide du lixiviat où elle existe alors en proportion bien plus importante.

Nous n'avons pas pu isoler le deuxième produit d'hydrolyse (= H) en quantité suffisante pour l'étudier seul. La substance principale obtenue par hydrolyse donne les mêmes réactions colorées que Y.

Il faut noter également que Y, comme la Saponarine, n'est pas totalement hydrolysée après 1 heure 30 de chauffage en milieu acide N, alors que dans les mêmes conditions, il ne subsiste plus de traces de rhamnosylvitexine.

Le tableau XXI donne les Rf des produits formés par hydrolyse de ces 3 flavonosides, ceux de la substance G et ceux d'une vitexine témoin.

Les résultats obtenus montrent :

l'identité du principal produit d'hydrolyse de Y avec la substance G, ainsi que la parenté entre G et la vitexine d'une part,

entre le produit secondaire d'hydrolyse de Y (= H) et l'isovitexine d'autre part.

Tableau -XXI - Rf ($\pm$ 0,02) des produits formés par hydrolyse chlorhydrique N après 1 heure 30 à l'ébullition

	Y non hydr.	Subst. Y hydrolysée		Subst. G (Bande 03)	Saponarine Hydrolysée		Rhamnosylvitexine Hydrolysée		Vitexine Témoin
		Spot sec.	Spot princ.		Spot sec. vitexine	Spot princ. Isovit.	Spot sec. Isovit.	Spot princ. Vitexine	
CCM gel siH A P E M	0,22	0,75	0,81	0,80	0,73	0,61	0,62	0,74	0,73
CCM gel siH B A F E	0,15	0,68	0,80	0,80	0,84	0,71	0,70	0,84	0,84
W_1 Partridge	0,35	0,67	0,57	0,57	0,49	0,71	0,70	0,51	0,50
W_1 Butanol Ethanol - eau	0,12	0,47	0,32	0,33	0,35	0,50	0,49	0,34	0,36
W_{20} AA 5 Rf. rut.	1,52	0,76	0,40	0,40	0,38	0,80	0,79	0,38	0,38

Néanmoins, les différences de Rf indiquent qu'il s'agit de corps très voisins mais non identiques. Les figures 31 , 32 reproduisent les chromatogrammes de l'hydrolyse dans le temps de la substance Y.

L'examen des spectres U. V., montre la très grande ressemblance des spectres donnés par Y et par la Saponarine, d'une part, par Y hydrolysé = G et la vitexine d'autre part. (exception faite cependant pour la bande I donnée par Y en présence d'acétate de sodium).

En présence de méthylate de sodium on observe un effet bathochrome important pour la bande I.

- de Y (58 nm) Saponarine (53 nm)
- de G (60 nm) Vitexine (59 nm)

ce qui prouve la présence d'un hydroxyle libre en 4'.

En présence d'acétate de sodium la bande II de Y est inchangée (comme pour la saponarine) mais après hydrolyse, cette bande est déplacée vers les grandes longueurs d'onde de 7 nm.

On peut en conclure qu'il existe un hydroxyle en 7 qui n'est pas libre dans la substance Y, mais qui est libre dans la substance G. Le sucre doit être fixé sur l'hydroxyle en 7 de la substance Y, et il est détaché par hydrolyse acide. Les chromatographies montrent que cette hydrolyse n'est pas encore totale après 1 heure 30 ou 2 heures, ce qui est en faveur d'une osidification sur l'hydroxyle en 7, puisque les 7 O-glucosides sont assez résistants à l'hydrolyse acide.

Le déplacement de la bande I vers les grandes longueurs d'ondes pour Y_1 ($\Delta\lambda$= 56 nm) comme pour la saponarine ($\Delta\lambda$= 56 nm) en présence d'acétate de sodium, indique aussi qu'il

Etude de l'hydrolyse acide de Y dans le temps.

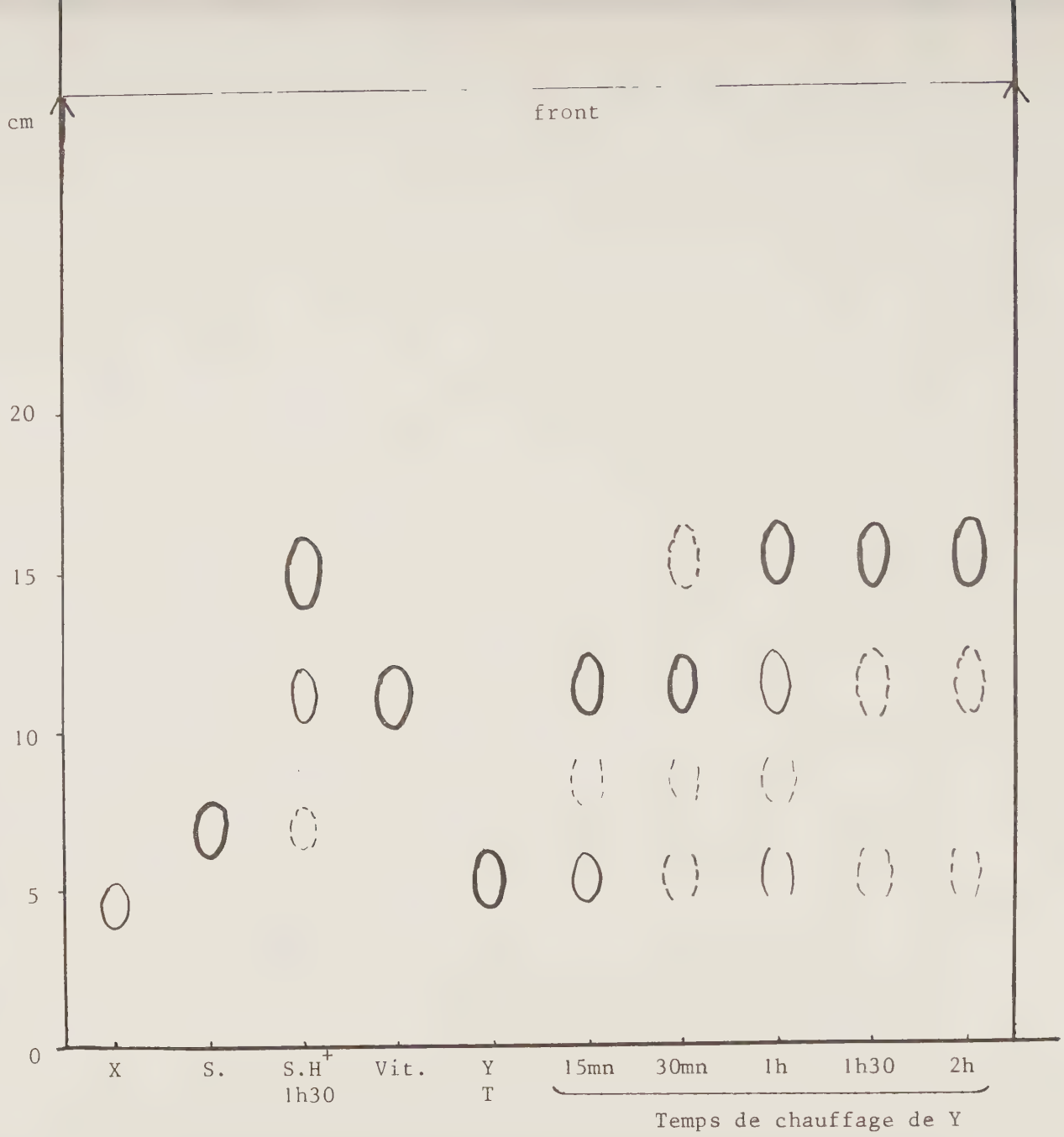
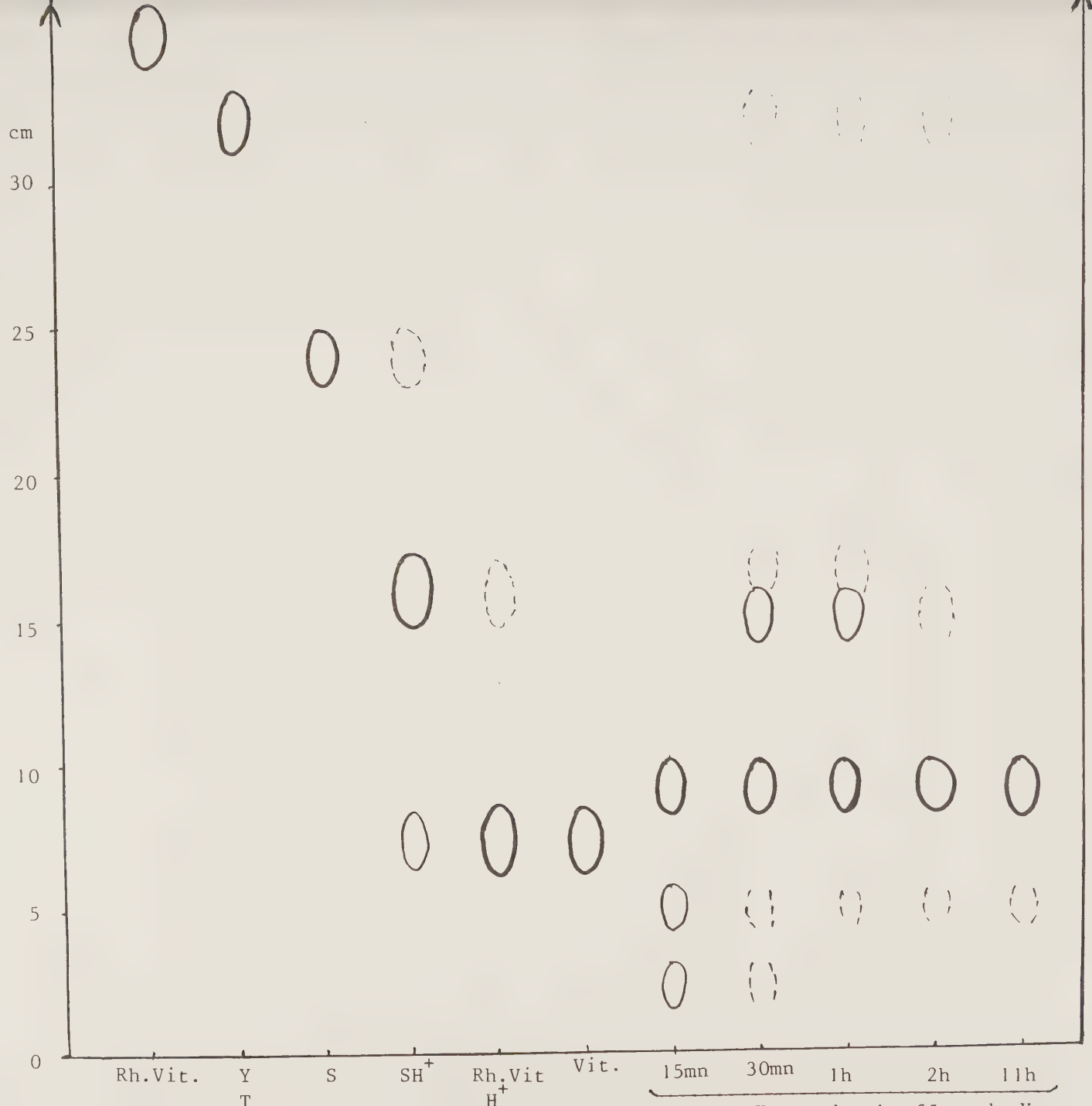


Fig. 31

Chromatographie descendante sur Papier Whatman n° 20

Solvant = Butanol 5
Ethanol 4
Eau 2,

Révélation = $AlCl_3$



Etude de l'hydrolyse acide de Y dans le temps.

Fig. 32

Chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1

Solvant = AA 5 %

Révélation = $AlCl_3$

existe un hydroxyle libre en 4'. L'action du chlorure d'aluminium se manifestant pour Y comme pour G par un dédoublement des pics, par un déplacement bathochrome de la bande Ia (44 nm pour Y ; 48 nm pour G) effets qui subsistent après l'addition d'acide chlorhydrique (pour Y, $\Delta\lambda$max = 42 nm ; pour G, $\Delta\lambda$max = 46 nm). On peut en conclure que Y et G possèdent tous deux un hydroxyle libre en position 5, et qu'il n'y a pas de groupe ortho-dihydroxylé libre en 3' - 4'.

Ce dernier point est confirmé par le spectre en présence d'acide borique, car il n'y a pas de différence sensible entre le spectre de la bande I dans le méthanol, et le spectre de cette bande I en présence d'acide borique.

Le tableau XXII indique les λmax des spectres U. V. de la substance Y, de la saponarine, de la substance G (= substance Y hydrolysée), de la vitexine et de l'isovitexine.

Identification de la partie sucrée, détachée par hydrolyse acide de la substance Y.

Par chromatographie en présence de glucose témoin, nous avons identifié le glucose, qui donne une tache importante très nette, mais, dans certaines chromatographies on voit des traces d'arabinose. Comme les chromatographies que nous avons effectuées parallèlement avec la saponarine hydrolysée donnent les mêmes indications, nous pensons qu'il s'agit d'un artefac, et que sur l'hydroxyle en 7 de la substance Y il y n'y a qu'un seulsucre qui est le glucose.

Tableau XXII Spectres UV comparés de :

	Y	Saponarine	Y hydrolysé = G	Vitexine	Isovitexine
CH_3 OH	272 - 334	271 - 336	271 - (303) - 334	270 - (302) - 336	271 - 336
Na CH_3O	272 (304) 392	271 (304) 389	278 325 394	279 329 395	278 329 398
A Cl_3	277 300 346 378	(268) 277 301 352 381	278 304 350 384	277 305 350 386	(262) 278 304 352 382
ACl_3 + HCl	278 300 344 376	279 300 344 378	277 302 344 382	278 303 343 383	(260) 280 302 344 380
CH_3COO Na	270 - 386	(261) 271 350 392	278 302 385	280 300 379	279 303 385
CH_3 COO Na + H_3 BO_3	270 - 336	269 - 341	271 - 338	271 (329) 344	274 346 (408)

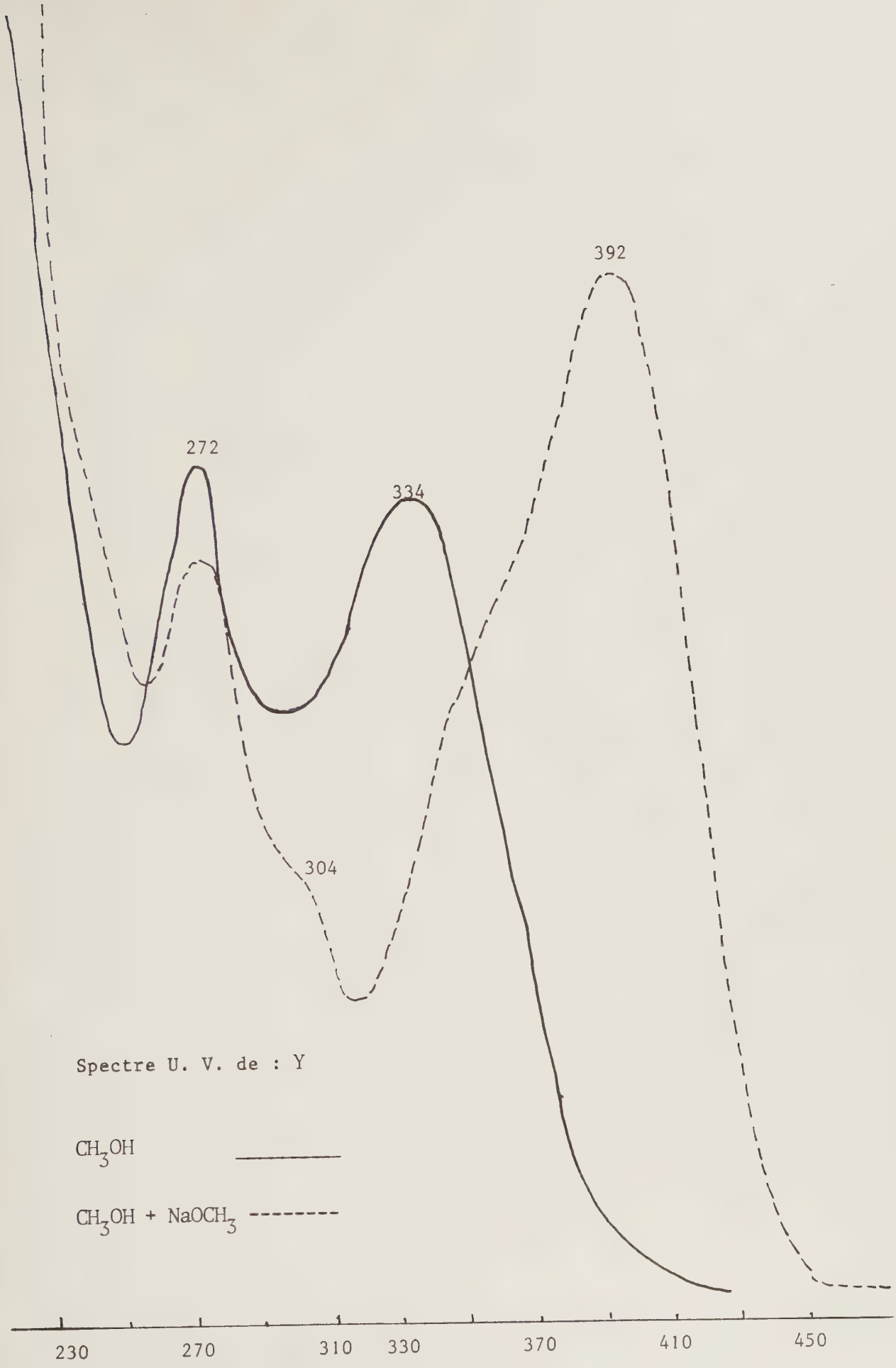
NB : Spectres Y et G sur appareil Beckmann D.B.
Pour témoins, chiffres indiqués par MABRY (66)

Les techniques utilisées pour identifier le glucose, et les résultats obtenus sont les mêmes que ceux que nous avons exposés pour la substance B.

Toutes ces données nous permettent de dire que la substance Y est

le O glucoside en 7 d'une mono-C-glycosyl 8 (ou 6) apigénine.

Nous pourrons préciser la nature du sucre fixé en 6 ou 8, quand nous posséderons assez de substance pour faire une étude comparative de G avec les corps de référence synthétisés par le Professeur CHOPIN.



Spectre U. V. de : Y

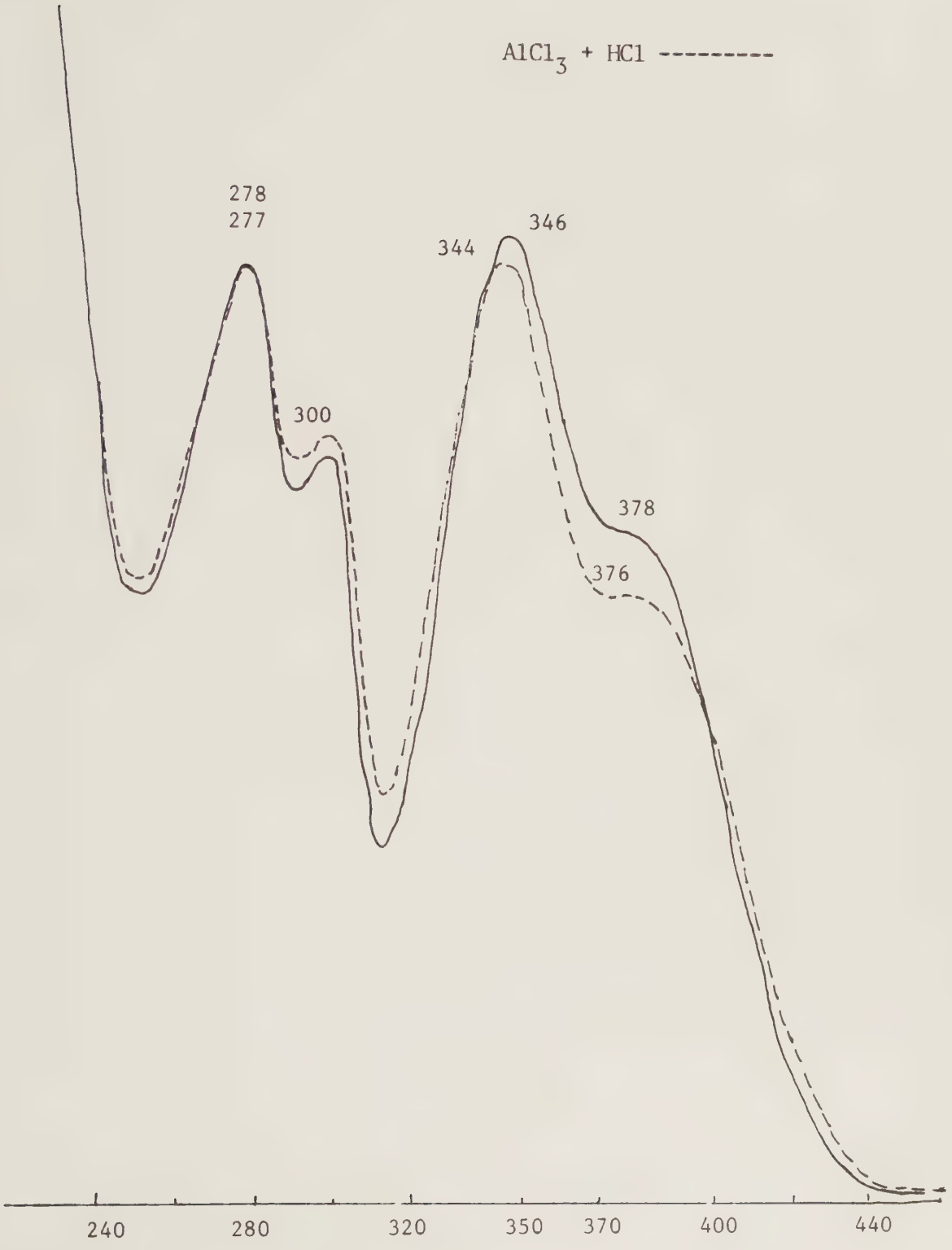
CH_3OH ——————

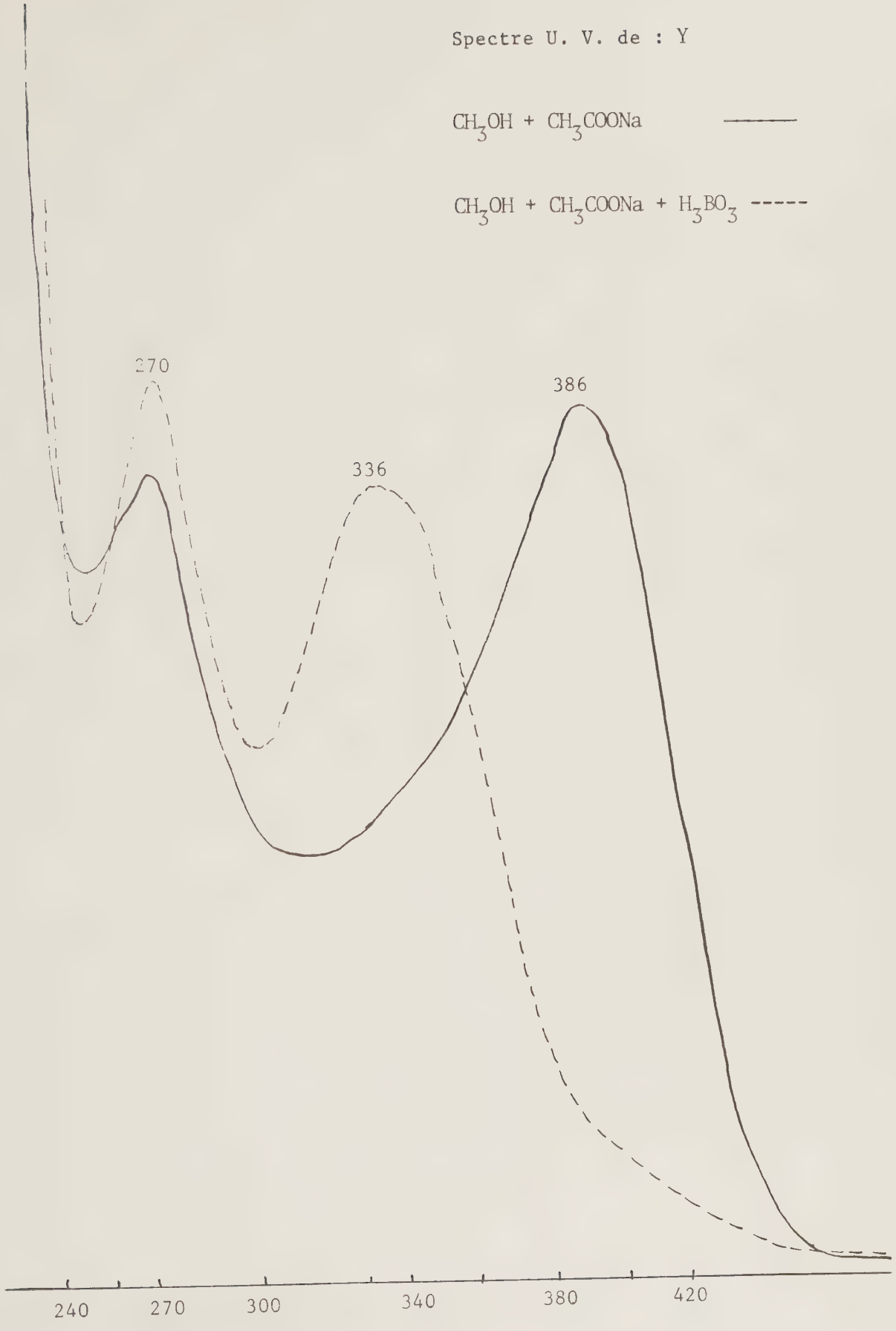
$CH_3OH + NaOCH_3$ --------

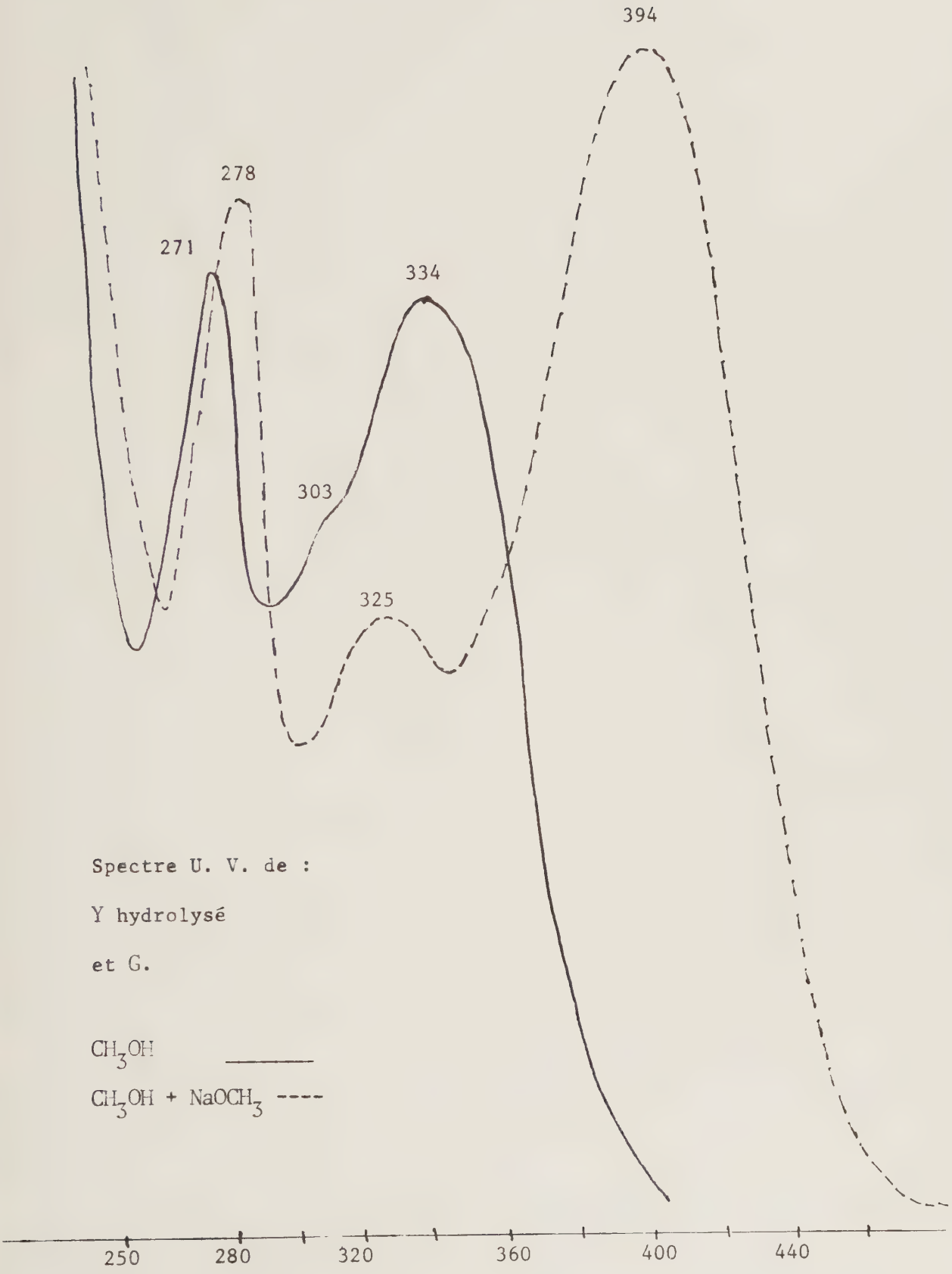
Spectre U. V. de : Y

$AlCl_3$ ————

$AlCl_3$ + HCl ---------




Spectre U. V. de : Y
$CH_3OH + CH_3COONa$
$CH_3OH + CH_3COONa + H_3BO_3$
270
336
386
240
270
300
340
380
420



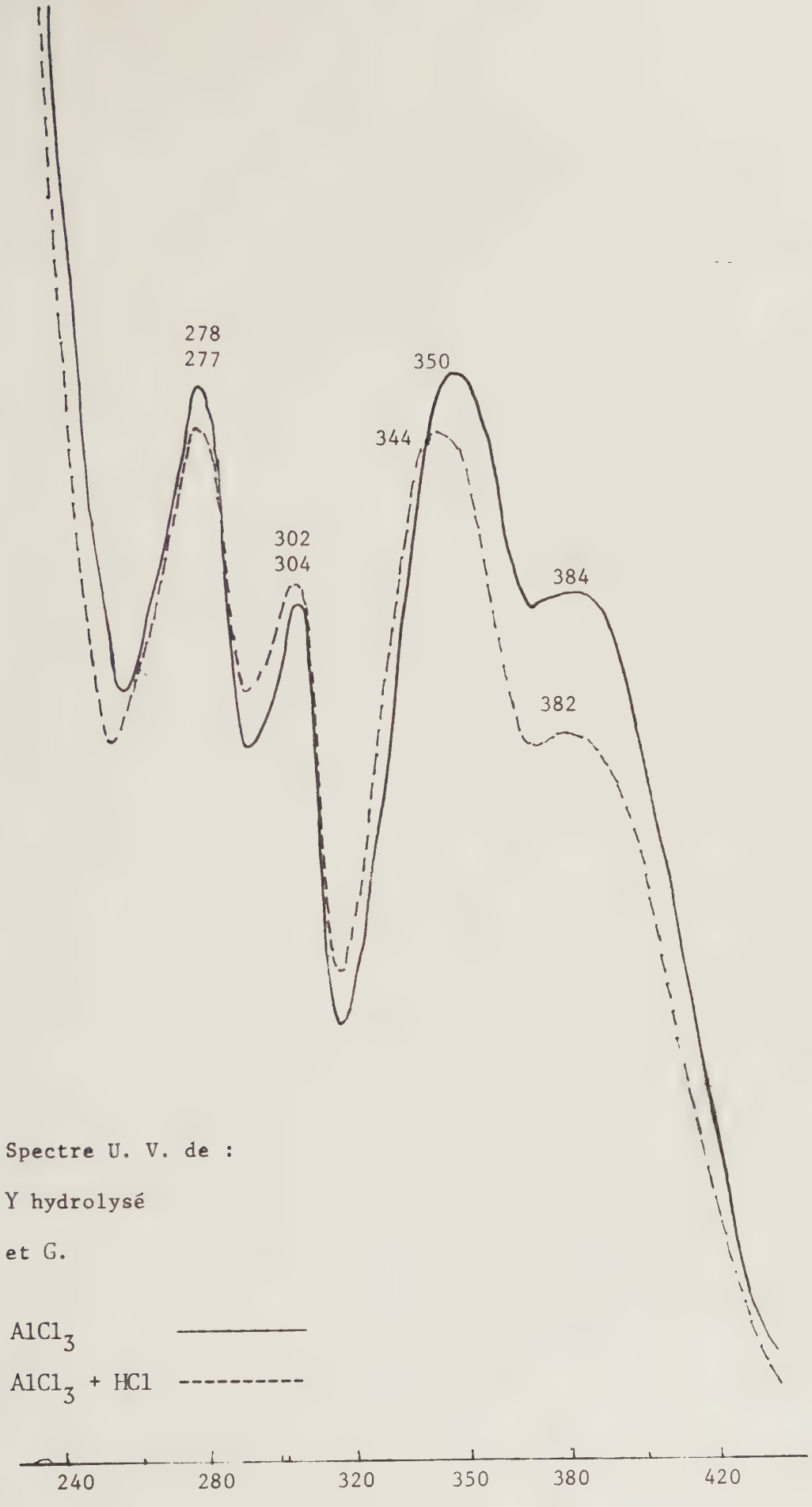
Spectre U. V. de :

Y hydrolysé

et G.

CH_3OH ———

$CH_3OH + NaOCH_3$ ----



Spectre U. V. de :

Y hydrolysé

et G.

$AlCl_3$ ————

$AlCl_3$ + HCl ----------

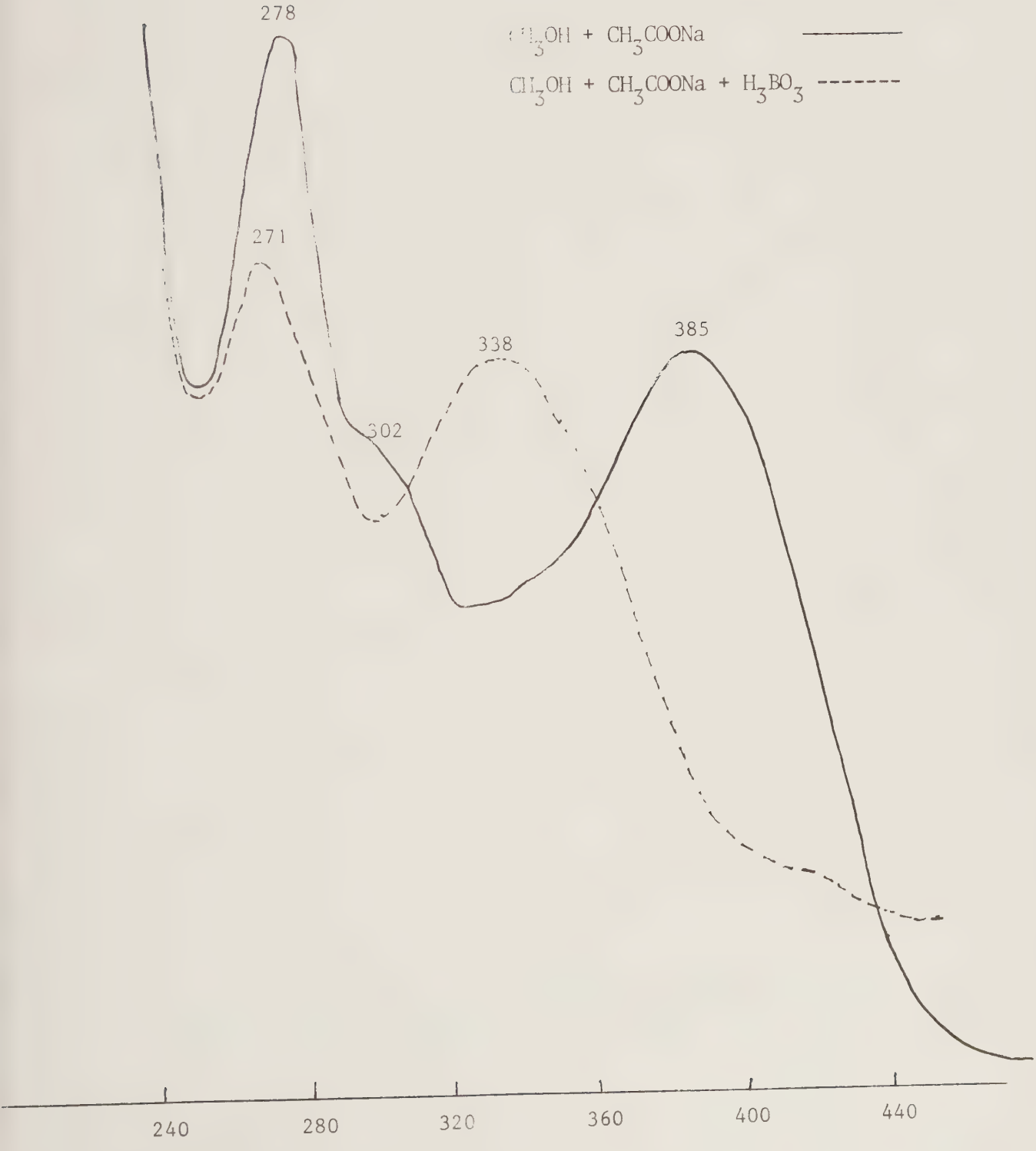
Spectre U. V. de :

Y hydrolysé

et G.

$CH_3OH + CH_3COONa$ ————

$CH_3OH + CH_3COONa + H_3BO_3$ -------



SUBSTANCE Z

La substance Z est obtenue en purifiant la bande 4 . Cette bande disparaît par hydrolyse acide du lixiviat ; elle n'existe pas dans tous les lots de *Spergularia* que nous avons analysés.

La substance Z est la plus délicate à isoler et à purifier de toutes celles que nous avons étudiées ; sous U. V. sans révélation elle se distingue à peine, surtout en présence des bandes très sombres données par les substances Y ou B (= Bandes 4* et 3). Lorsqu'on chauffe, même légèrement, pour évaporer les solutions alcooliques fournies par l'élution des chromatogrammes développés avec l'acide acétique à 5 %, on hydrolyse la substance. Ce flavonoside est également très sensible à l'oxydation. Il faut évaporer, pratiquement à tous les stades, sous courant d'azote et à froid, ou sous vide sulfurique. La purification demande des chromatographies répétées sur W_{20} avec $AA_{5\ \%}$ pour éliminer toute trace de la substance Y. Si on veut récupérer la substance non altérée, il est préférable de ne pas utiliser le solvant de Partridge.

Réaction colorées de Z

La substance Z a une fluorescence jaune avec le chlorure d'aluminium.

Elle donne une belle coloration rouge-orangé très vive, avec l'acétate basique de plomb.

La couleur jaune apparue par pulvérisation avec le réactif de Bénédict, disparaît si on l'examine en U. V..

La réaction de la cyanidine est positive, et il se développe une coloration orange. IL semble donc que l'on ait affaire à une flavone O-dihydroxylé, type lutéoline.

Or le spectre U. V. dans le méthanol présente bien un pic à 272 nm qui peut correspondre à la bande II d'un dérivé du type lutéoline, mais la bande I possède une λ max = 323 nm, ce qui élimine cette possibilité.

Le spectre en présence de chlorure d'aluminium fait penser à un dérivé de l'apigénine ou plutôt de l'acacétine(λ max CH_3OH = 323 nm) ; mais cette dernière hypothèse doit être abandonnée quand on examine le spectre du produit après addition de méthylate de sodium.

Le lavage par l'éther de la solution aqueuse acide de la substance Z, n'amène aucun changement.

Mais l'hydrolyse alcaline, donne un acide organique de type cinnamique, et un flavonoside (Z') dont le comportement chromatographique est peu modifié, mais qui donne des réactions colorées différentes de celles données par le corps acylé.

Réactions colorées de Z' (= Z après hydrolyse alcaline)

La couleur jaune obtenue avec le réactif de Bénédict est avivée sous U. V.

et surtout le composé Z' se colore en jaune avec l'acétate basique de plomb.

Le spectre U. V. est également modifié (λ max avec CH_3OH : 270 et 332 nm).

Une hydrolyse acide du composé Z', libère alors un ose, et un nouveau flavonoside qui semble identique à la substance X isolée par ailleurs.

Comportement chromatographique :

Sur gel de silice avec A. P. E. M. Z ou Z', comme le flavonoside obtenu par hydrolyse acide, migrent dans la zone des di-C-glucosides d'apigénine.

T A B L E A U XXIII : Rf sur CCM gel de silice avec A. P. E. M.

Z et Z'	Z' hydrolysé H^+	X	Schaft
0,25	0,21	0,21	0,24

Rf obtenus dans d'autres conditions

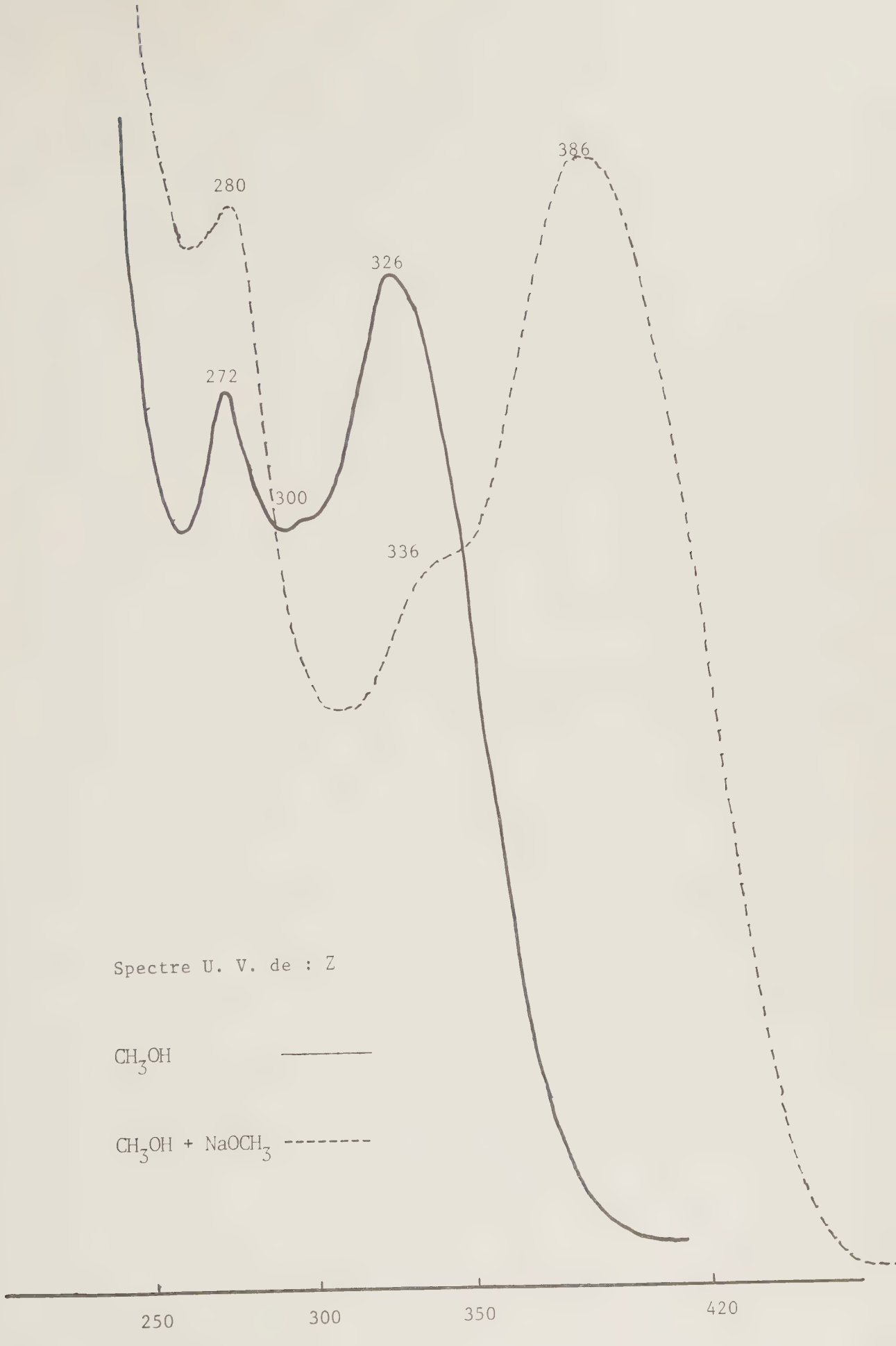
	Z	Z' hydrolysé H^+	X	Y	Vitexine
W_{20} AA_5 Rf rut	1,49	0,94-1,05	0,95-1,1	1,51	0,38
CCM cellulose AA 2 %	0,51	0,35	0,35	0,62	0,13
W_{20} Partridge	0,28	0,08	0,08		
W_1 Partridge	0,71	0,54	0,55		

L'examen de ces Rf pourrait nous conduire à affirmer que la substance Z est un dérivé acylé et glycosylé de notre substance X, mais nous n'avons pas pu, à cause du manque de produits purifiés, effectuer encore toutes les vérifications nécessaires ; nous n'avons fait en particulier que le spectre U. V. de la substance hydrolysée dans le méthanol.

Nous n'avons pas pu non plus identifier le sucre libéré par hydrolyse acide, mais nous avons par contre, identifié l'acide. Il s'agit de l'acide férulique, comme le prouve le spectre U. V., dans le méthanol, de la phase éthérée d'extraction après hydrolyse alcaline (λmax : 318 - 292 - 232 nm) (64) et surtout les chromatographies en présence de témoin ainsi que la coloration obtenue avec le réactif à la p. nitraniline et le carbonate de sodium : coloration rose qui passe au bleu gris après le carbonate de sodium ; en U.V. avant tout réactif : coloration bleue intense, devenant bleu turquoise sous l'action des vapeurs de NH_3.

TABLEAU XXIV	Acide estérifiant la substance Z'	Acide férulique témoin
CCM Cellulose AA 2 %	0,70 0,26	0,71 0,27
CCM cellulose AA 5 %	0,84 0,59	0,85 0,60
CCM cellulose HCl 0,1 N	0,71 0,26	0,72 0,25
W n° 20 AA 5 % Rf rut.	1,72 0,94	1,73 0,96

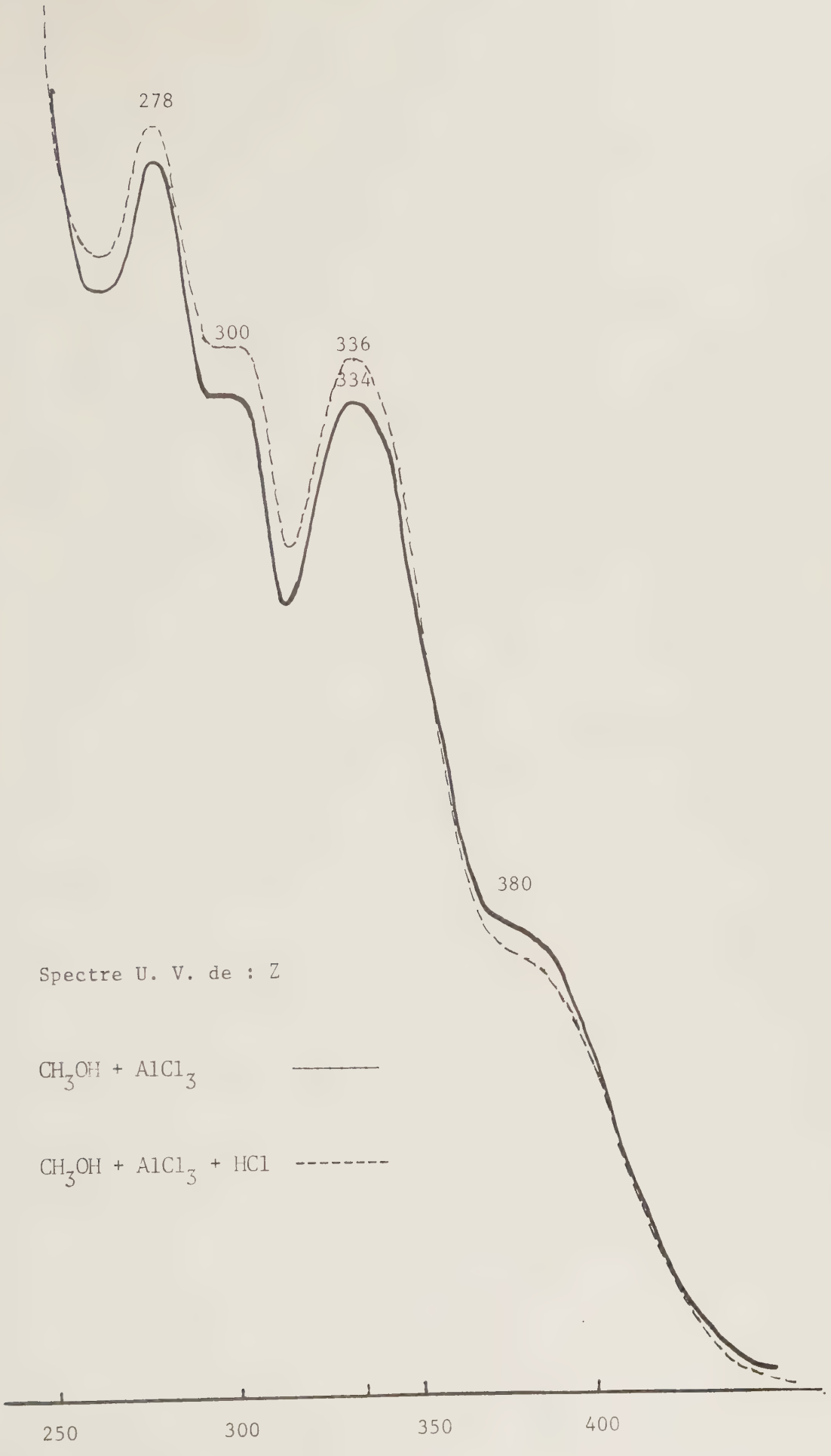
La substance Z initiale, serait donc l'ester férulique d'une O-glycosyl-vicénine.



Spectre U. V. de : Z

CH_3OH ————

$CH_3OH + NaOCH_3$ --------



Spectre U. V. de : Z

$CH_3OH + AlCl_3$ ———

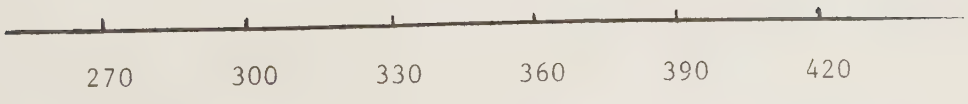
$CH_3OH + AlCl_3 + HCl$ --------

Spectre U. V. dans

CH_3OH de Z traité par

NaOH, après extraction

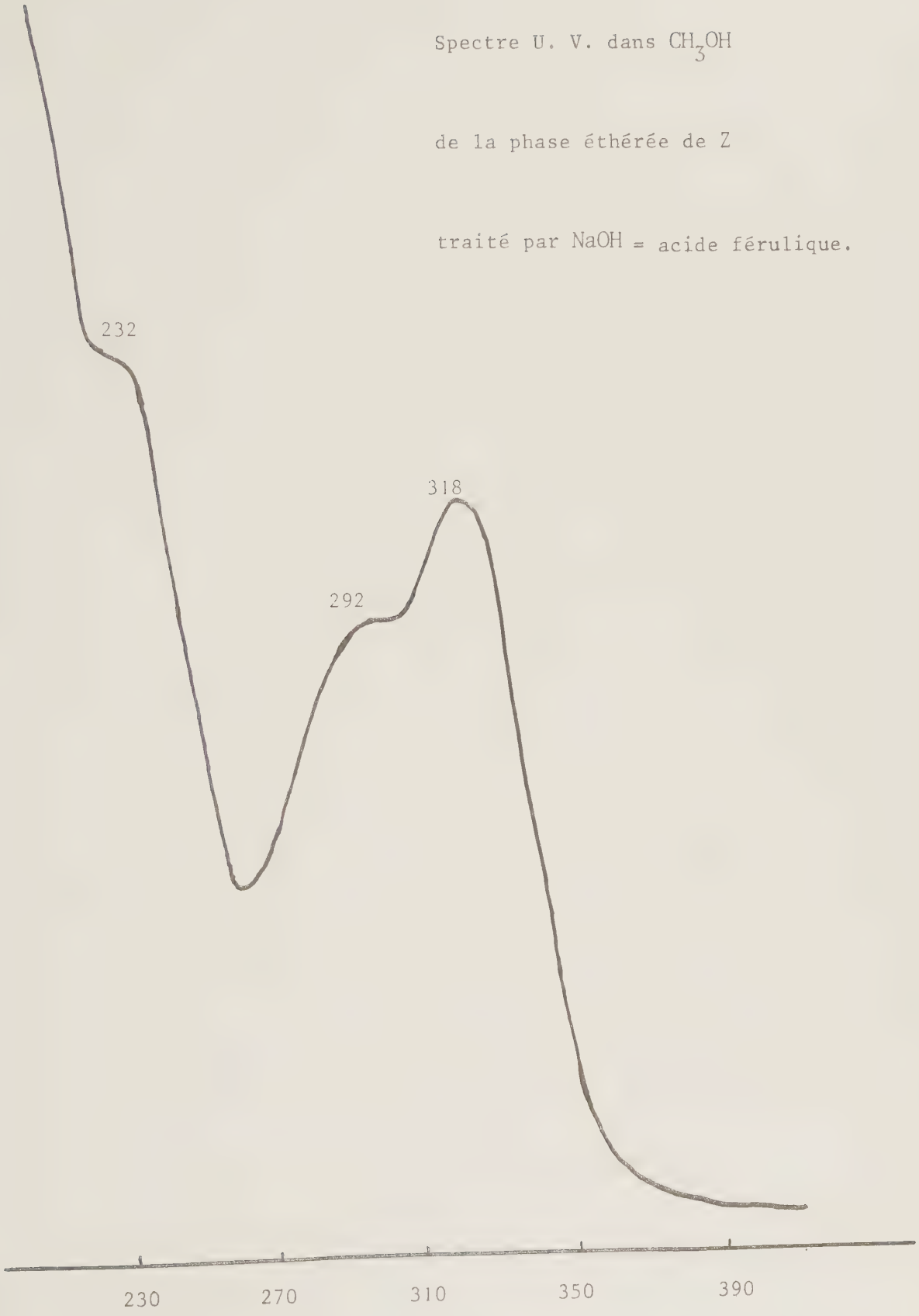
à l'éther = Z'

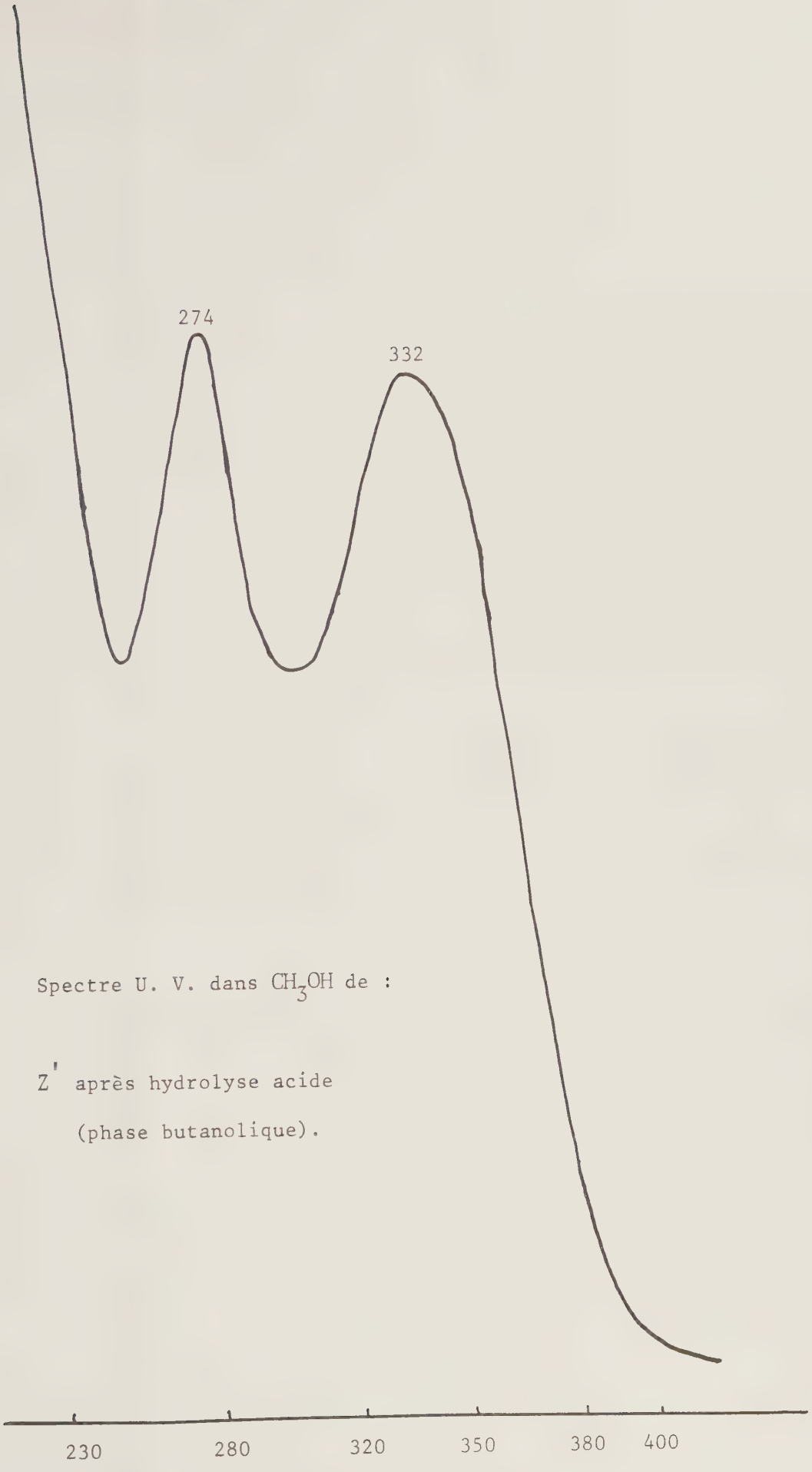


Spectre U. V. dans CH_3OH

de la phase éthérée de Z

traité par NaOH = acide férulique.





Spectre U. V. dans CH_3OH de :

Z' après hydrolyse acide

(phase butanolique).

S U B S T A N C E B

La bande 3 est purifiée tout d'abord en chromatographiant l'éluat dans les conditions de son isolement (W_{20} AA_5).

Après s'être assuré, par chromatographie bidimensionnelle, que l'éluat ne contient plus qu'un seul dérivé flavonique, on fait migrer sur W_1 avec le solvant de PARTRIDGE. On élimine ainsi les traces d'un acide organique de type cinnamique qui se déplace comme la substance B dans l'acide acétique dilué. Avec le Partridge la substance B reste pratiquement au point de départ, et l'acide va au front du solvant.

La substance B migre à peine sur gel de silice H avec A. P. E. M., et reste en dessous de la zone des di-C-glycosides. Il doit s'agir d'une substance très glycosylée, ce que confirment les Rf suivants :

TABLEAU XXV	CCM gel si. H A. P. E. M.	CCM cellulose AA 2 %	W_{20} AA_5
Substance B	0,09	0,61	Rf rut 1,39
Substance X	0,21	0,35	Rf rut 1,05
Schaftoside	0,25	——	Rf rut 1,12
Substance A	0,16	0,24	Rf rut 0,80

Réactions colorées :

B donne une coloration jaune foncé avec le chlorure d'aluminium.

Jaune foncé également avec l'acétate basique de plomb.

Jaune clair fluorescent sous U. V. après pulvérisation du réactif de BENEDICT.

La réaction de la cyanidine donne une couleur orangée.

Cette flavone ne doit donc pas posséder de groupement O-dihydroxylé en 3' - 4'.

Les spectres U. V. dans le méthanol seul, et les déplacements spectraux en présence de chlorure d'aluminium après addition d'acide chlorhydrique, et en présence de méthylate de sodium sont du type C-glycosides d'apigénine à groupements hydroxyles 5, 7 et 4' libres. Néanmoins, les spectres en présence d'acétate de sodium et d'acide borique ne présentent pas les déplacements habituels pour ces corps. (Tableau XXVI).

L'hydrolyse alcaline n'apporte pas de modification dans le spectre, ni dans le comportement chromatographique de la substance B.

Mais l'hydrolyse acide (milieu HCl N 1 heure 30 - 100°) donne naissance à un ose au moins, et à un nouveau flavonoside dont les caractéristiques sont totalement différentes.

Le flavonoïde apparu possède les caractéristiques chromatographiques de la substance A ; sur W_1 avec Partridge, sur W_{20} avec AA 5 %, sur CM cellulose avec AA 15 %. Il s'agit donc toujours d'un hétéroside.

Comme la substance A, il donne une coloration rouge-orangé avec l'acétate basique de plomb et la couleur jaune apparaissant par pulvérisation du réactif de BENEDICT n'est plus visible sous U. V. (groupement orthodihydroxylé en 3' - 4').

T A B L E A U XXVI : Comparaison des max. des spectres U. V.

1°) de B avant hydrolyse (B) et de l'isovitexine (isovit)

2°) de B après hydrolyse (BH^+) et de l'orientine (or.)

CH_3OH	B		272			334		BH^+	258	270	(300)		352
	Isovit.		271			336		Or.	255	267	(293)		346
$NaOCH_3$	B		280		(334)	404		BH^+	(238)	268	(280)	(334)	406
	Isovit.		278		(329)	398		Or.		268	(278)	(334)	405
$AlCl_3$	B	(266)	280	300	350	380		BH^+		276	(302)	332	428
	Isovit.	(262)	278	304	352	382		Or.		276	(302)	329	429
$AlCl_3$ + HCl	B	(262)	282	301	342	380		BH^+	(264)	280	(302)	356	385
	Isovit.	(260)	280	302	344	380		Or.	(265)	276	296	357	384
CH_3COONa	B		278		(324)	394		BH^+					
	Isovit.		279		(303)	385		Or.					
CH_3COONa + H_3BO_3	B		276			322		BH^+					
	Isovit.		274		346	(408)		Or.					

N. B. Les chiffres entre parenthèse indiquent les inflexions.

Enfin, après une première purification du produit, on obtient des spectres U. V. comparables à ceux de la substance A mais présentant cependant certaines différences (Tableau XXVI). Ce sont des spectres de C-glycoside de type lutéoline (orientine, isoorientine) possédant un groupe orthodihydroxylé en 3' - 4' : les complexes aluminiques ne sont pas stables en présence d'acide chlorhydrique ; nous n'avons pas pu obtenir de spectre satisfaisant en présence d'acide borique et nous pensons que notre produit est encore insuffisamment purifié.

Les résultats déjà obtenus nous amènent à penser que la partie glucidique qui est libérée par hydrolyse était fixée en 3' ou en 4'.

Nature de la partie osidique :

Nous avons identifié le glucose, sans difficultés, par chromatographie dans 4 solvants différents en présence de témoin. Mais sur certains chromatogrammes on distingue aussi un spot à la hauteur du rhamnose.

- CCM Kieselguhr G, tampon pH 5.

solvant : butanol - acétone - tampon pH 5.

Rf glucose témoin = 0,60

Rf ose inconnu = 0,59

- Papier Whatman n°1

T A B L E A U XXVII :

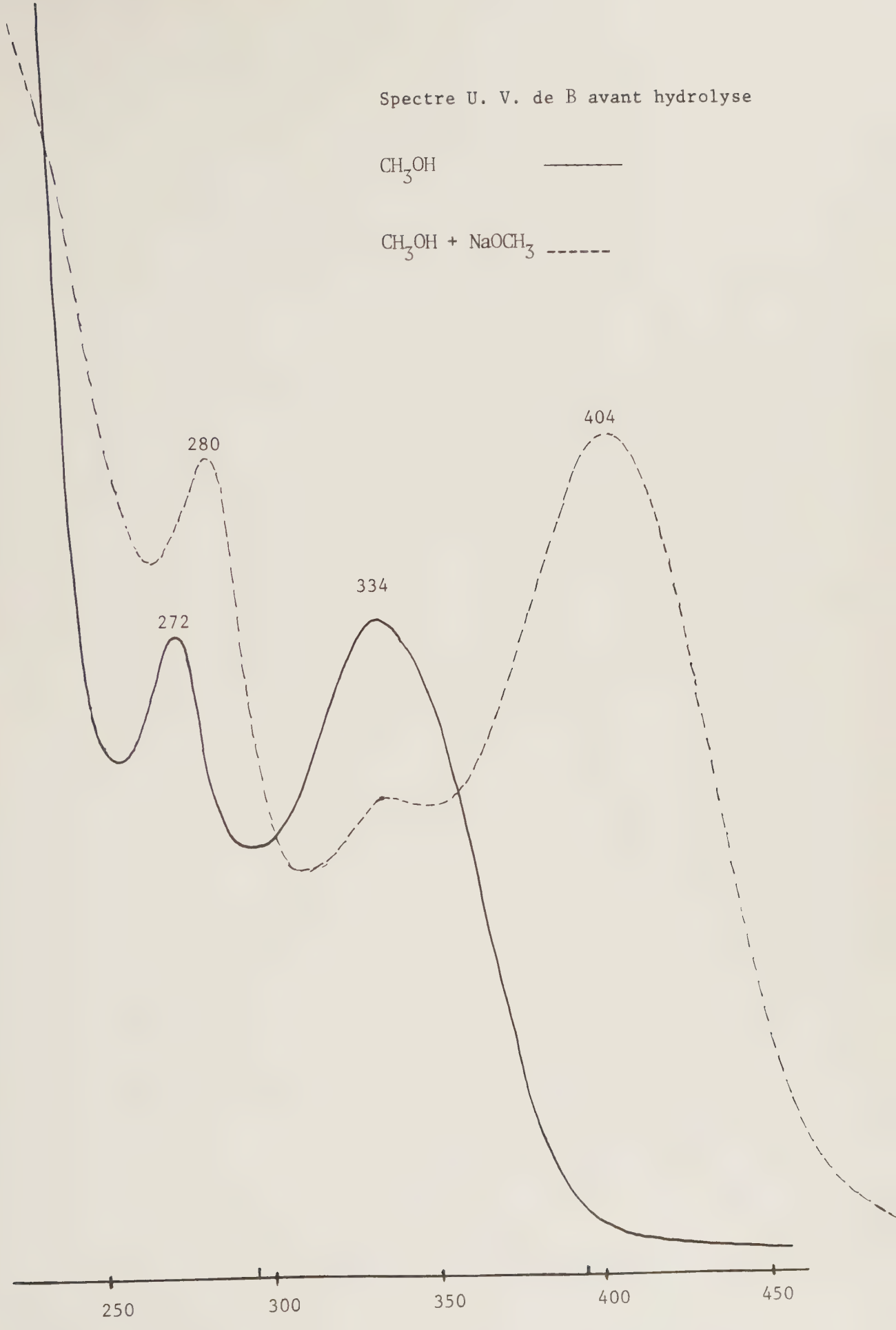
Rf	glucose T	Spot + + +	rhamnose T	Spot +
Solvant PARTRIDGE	0,10	0,10	0,28	0,26
Solvant Butanol - eau - Pyridine	0,30	0,30		
Solvant Acétate d'éthyle - eau - Pyridine	0,46	0,47		

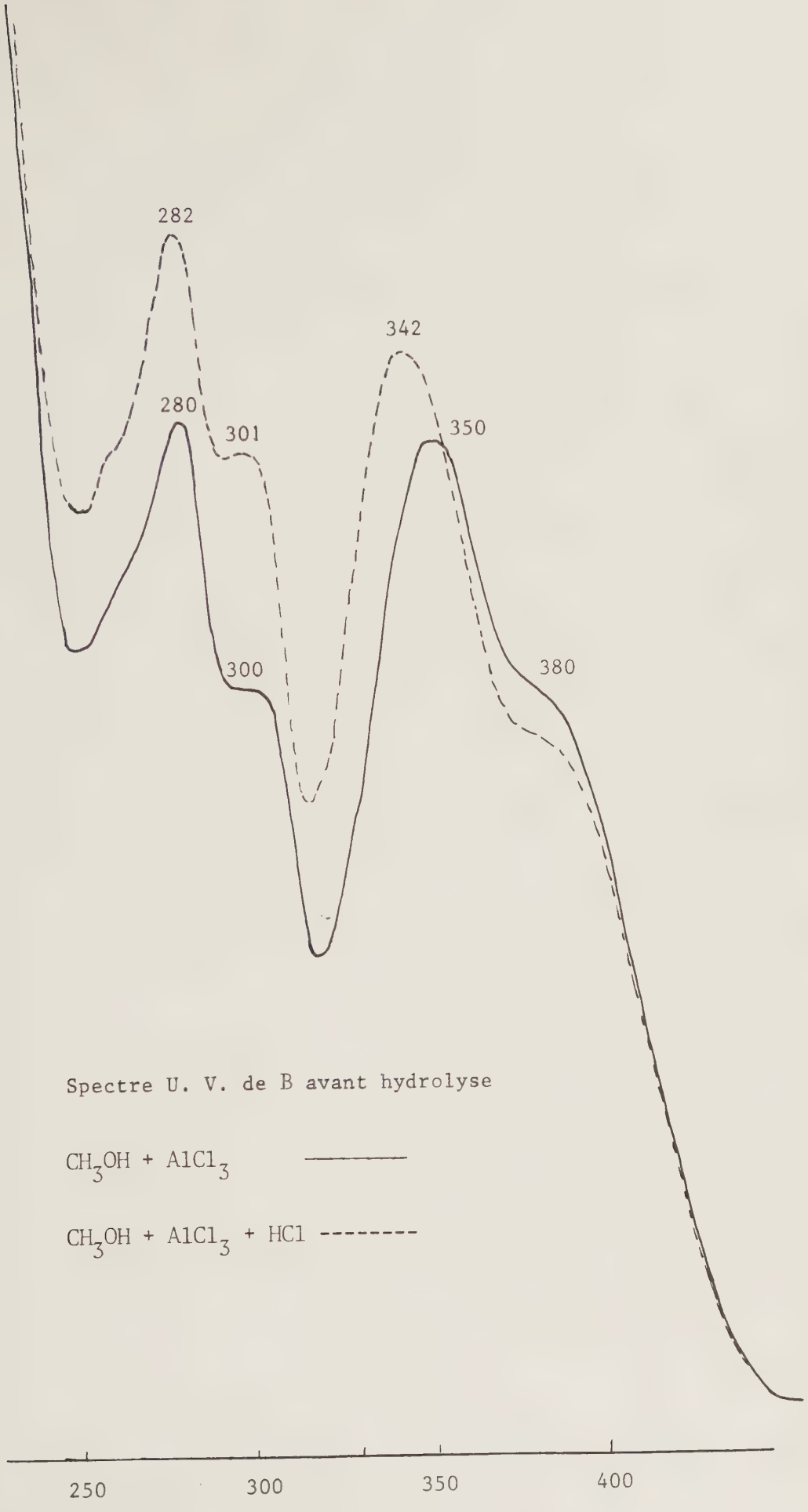
La substance B pourrait être la O-glucosyl-4' (ou 3') d'un di - C - glycosyl - 6,8 lutéoline.

Spectre U. V. de B avant hydrolyse

CH_3OH ————

$CH_3OH + NaOCH_3$ ------

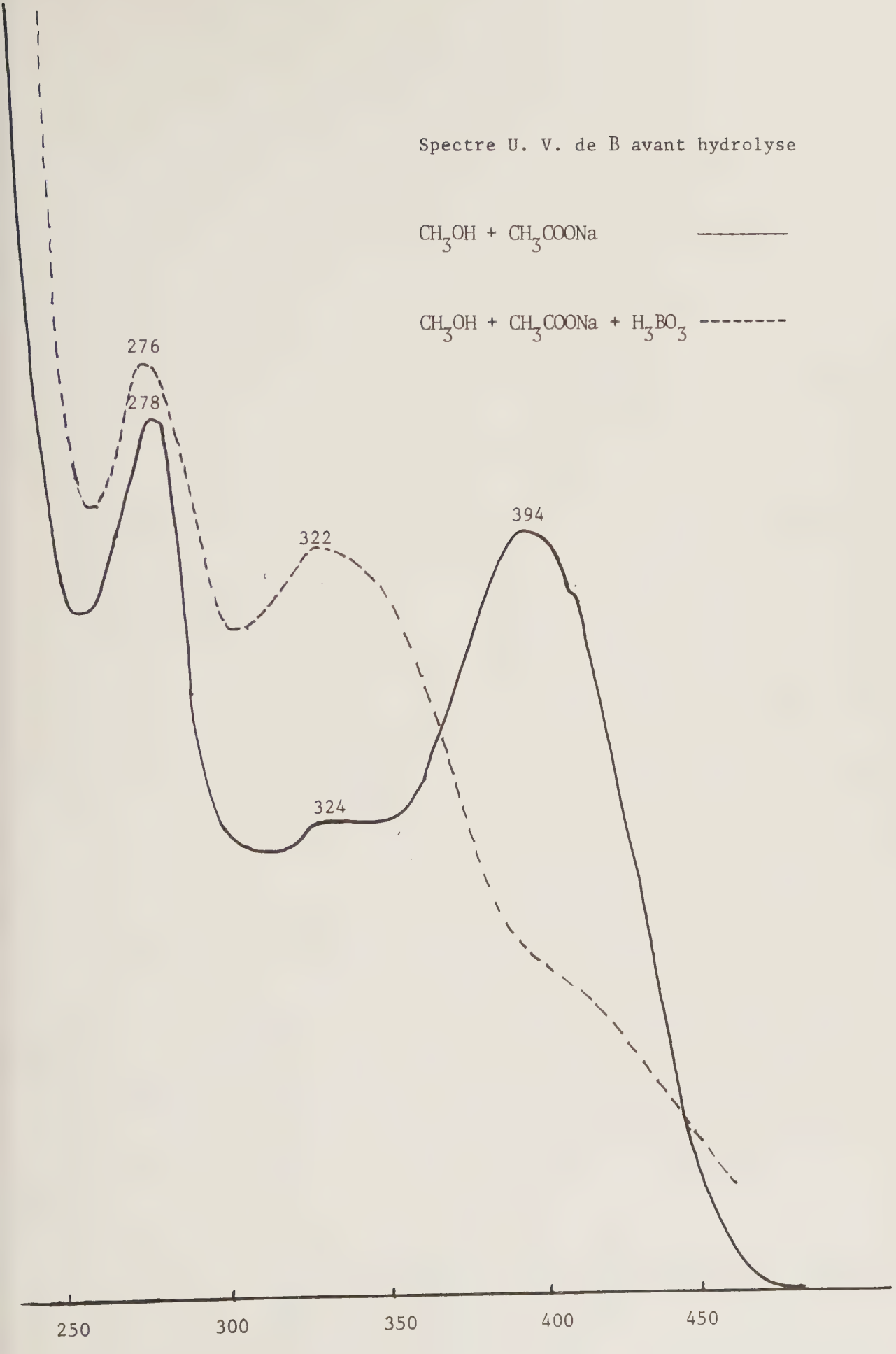


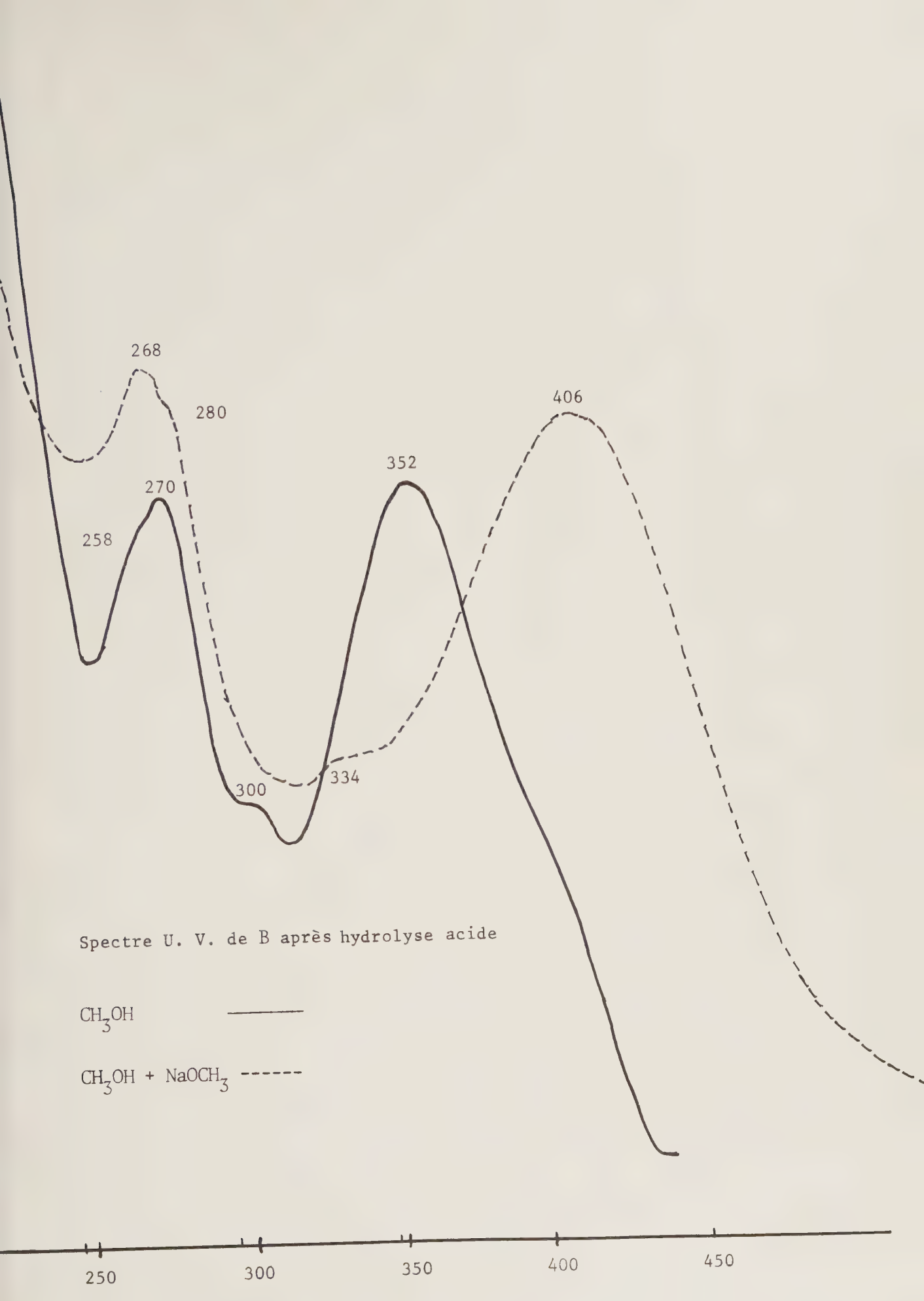


Spectre U. V. de B avant hydrolyse

$CH_3OH + AlCl_3$ ————

$CH_3OH + AlCl_3 + HCl$ --------

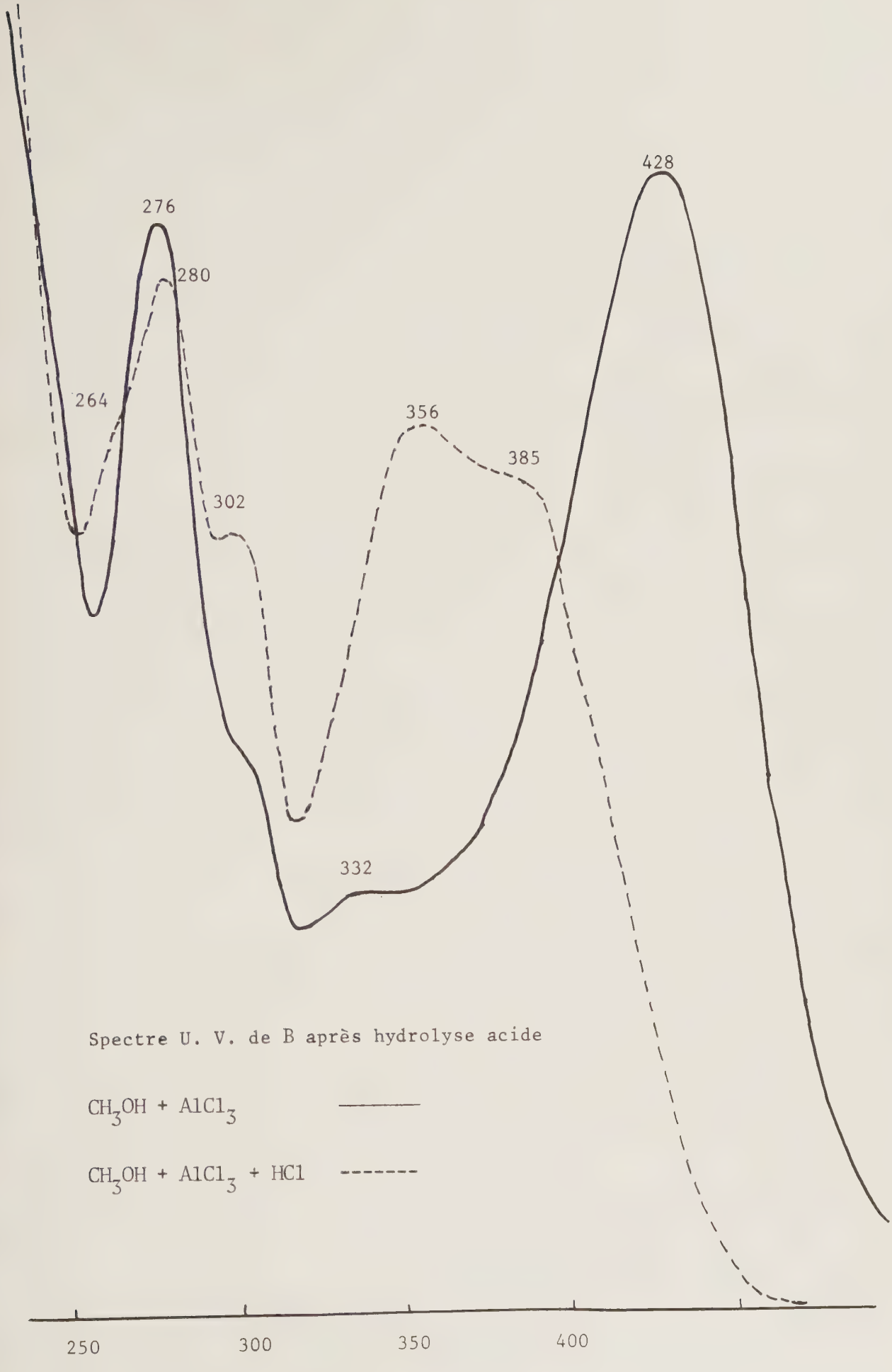

Spectre U. V. de B avant hydrolyse
CH3OH + CH3COONa
CH3OH + CH3COONa + H3BO3
276
278
322
394
324
250
300
350
400
450



Spectre U. V. de B après hydrolyse acide

CH_3OH ———

$CH_3OH + NaOCH_3$ ------



Spectre U. V. de B après hydrolyse acide

$CH_3OH + AlCl_3$ ————

$CH_3OH + AlCl_3 + HCl$ -------

S U B S T A N C E K

On l'obtient en purifiant les éluats de la bande 02 par chromatographie descendante sur Whatman n° 1 avec l'acide acétique à 10 % pendant 14 à 16 heures. Pour achever la purification il faut parfois chromatographier aussi sur Whatman n° 1, avec le solvant de PARTRIDGE, sur 30 cm environ.

La substance K existe en faible quantité dans les lixiviats obtenus directement à partir de *Spergularia rubra* ; on la trouve en quantité plus importante après hydrolyse chimique acide de ces lixiviats. Par hydrolyse acide de la substance Y, il se forme un peu de cette substance K, à côté des substances G et H. Elle résulte peut-être d'une isomérisation de la substance G, mais nous n'en avons pas décelé après chauffage en milieu acide de la substance G isolée.

Comportement chromatographique :

Sur gel de silice H, avec l'A. P. E. M., la substance K migre au sommet de la zone des mono-C-glycosides :

Rf substance K : 0,85

Rf substance G : 0,81

Rf Vitexine : 0,73

Rf Isovitexine : 0,61

Les aglucones migrent au front du solvant.

Sur papier, les Rf de la substance K sont indiqués dans le tableau suivant, à côté de ceux de l'apigénine et de ceux de la substance G (= mono-C-glycoside d'apigénine).

Tableau XXVIII	W_{20}-AA_5	W_1-AA_{15}	W_{3MM} Partridge
Rf_{rut} Ap.	0	0,17	1,59
Rf_{rut} K	0,17	0,32	0,48
Rf_{rut} G	0,30	0,46	0,76

La comparaison de ces divers Rf montrent que nous avons bien affaire à un glycoside et non à un aglucone.

Réactions colorées :

Sous U. V., la substance K apparait en brun sombre avant révélation,

elle présente une fluorescence jaune après pulvérisation de chlorure d'aluminium, d'acétate basique de plomb, ou de réactif de Bénédict. (Pas de groupe orthodihydroxylé sur le noyau B.) Dans certains lots de drogue cependant, la bande de Rf_{rut} = 0,12 à 0,19 (W_{20}-AA_5) donne une coloration orangée avec l'acétate de plomb (= Bande 02^{bis}). Après purification chromatographique la substance isolée donne toujours la même coloration orangée, et la bande I du spectre U. V. dans le méthanol présente une λ max. à 346 nm. (La bande II n'a pas de pic nettement défini) ; en présence de chlorure d'aluminium la λ max. de la bande Ia est 422 nm (fort effet bathochrome = -OH libre en 5.), mais le complexe aluminique est détruit par addition d'acide chlorhydrique (décoloration de la solution et effet hypsochrome sur bande Ia' ; $\Delta\lambda$ max. Ia' = -60 nm). Ce spectre ressemble donc à un spectre type lutéoline.

Cependant, par hydrolyse alcaline, la bande 02^{bis} purifiée, engendre une substance K', dont les réactions colorées et les hauteurs de migration sur W_{20} avec AA_5 ou sur W_1 avec le solvant de PARTRIDGE, sont les mêmes que celles de la substance K. Nous n'avons pas pu mettre en évidence l'acide qui a du être libéré par hydrolyse alcaline et nous n'avons pas encore effectués d'autres vérifications sur ce flavonoside K'. Nous ne savons donc pas s'il donnera des spectres semblables à ceux de la vitexine et de l'isovitexine. (Tableau XV p.109)

Mais en l'absence de produits de référence, nous ne savons pas quelle est la constitution exacte de la substance K, qui possède les caractéristiques spectrales et chromatographiques d'un mono-C-glycoside d'apigénine.

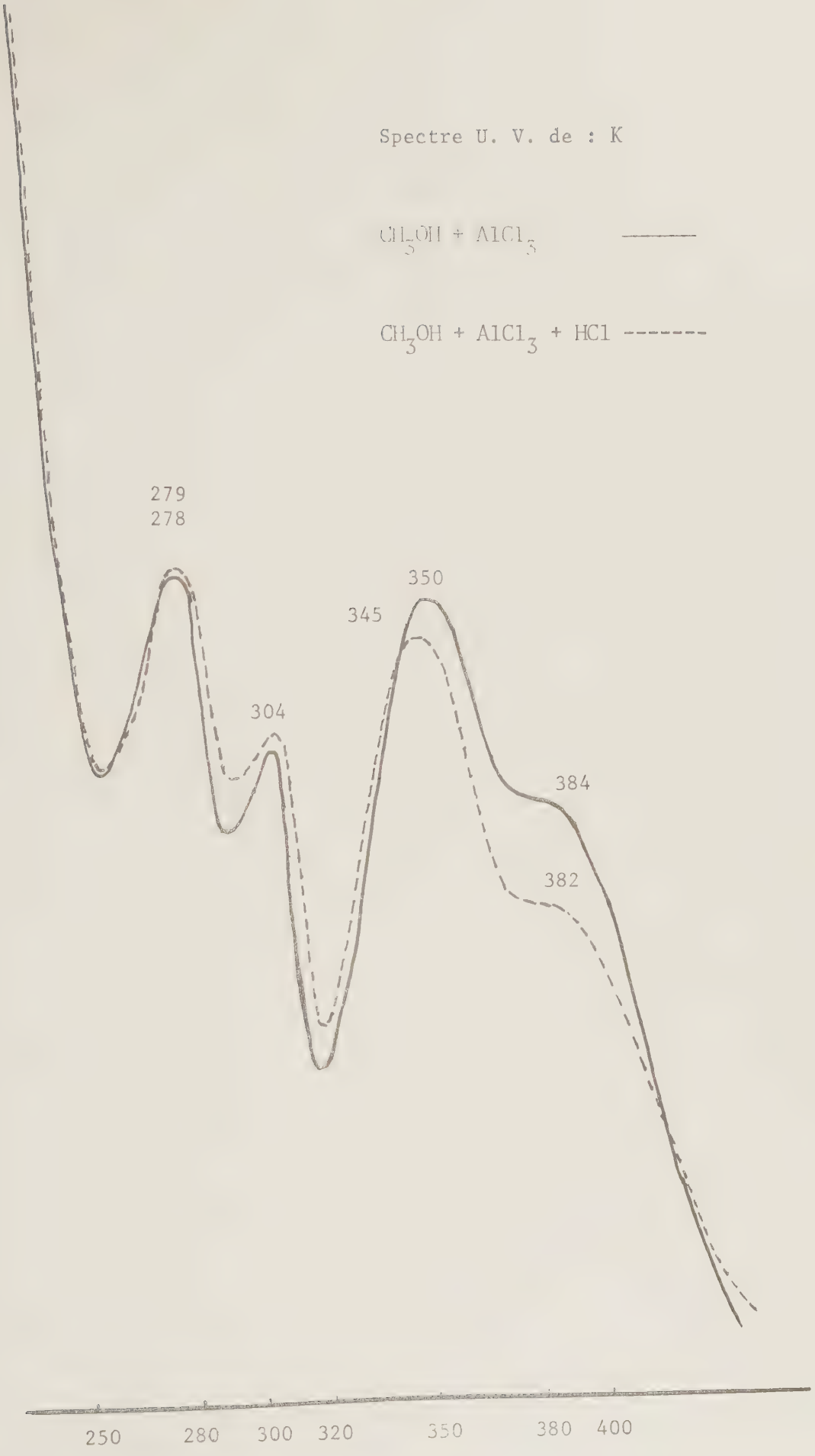
Spectre U. V. de : K

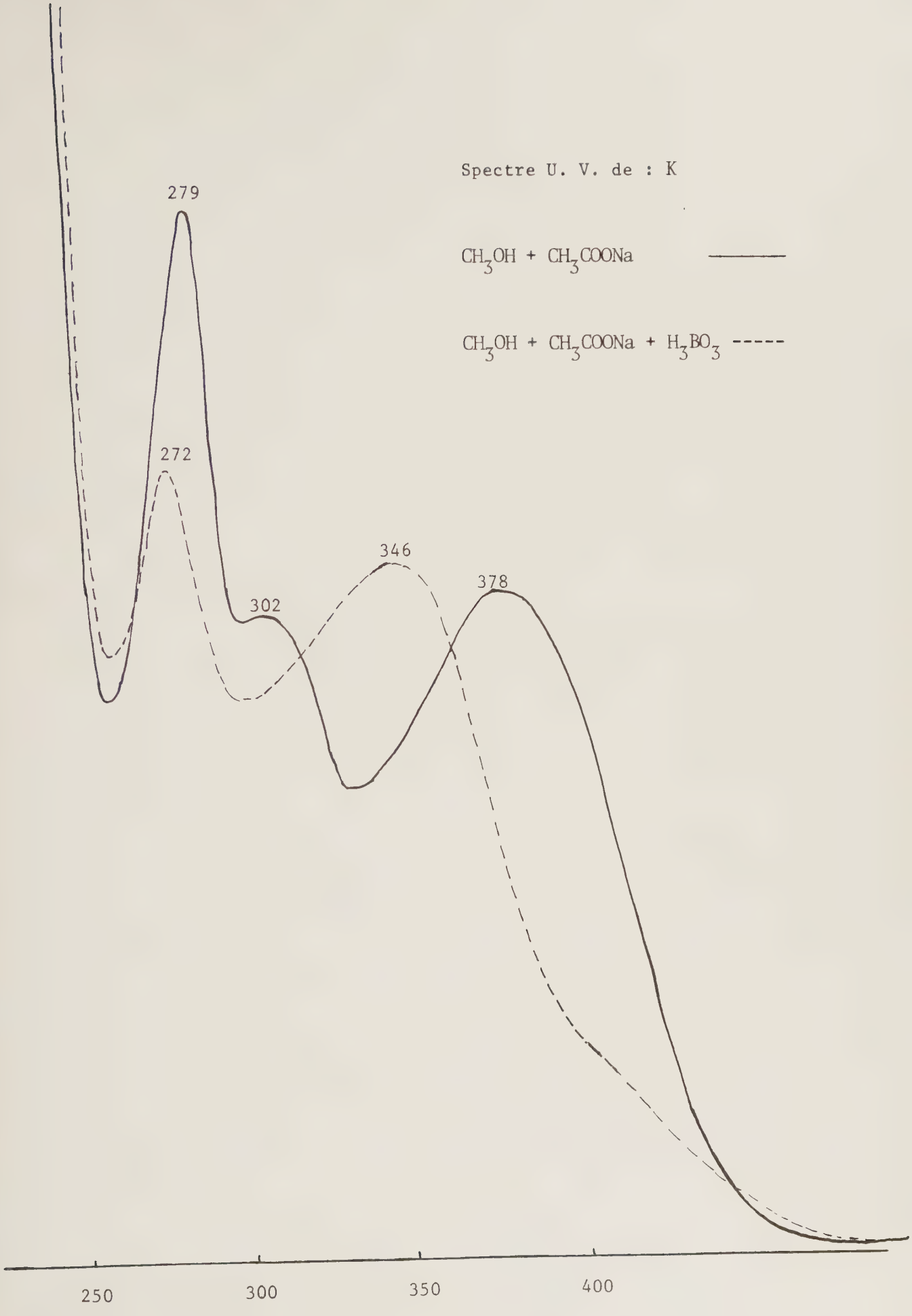
CH_3OH

Spectre U. V. de : K

$CH_3OH + AlCl_3$ ———

$CH_3OH + AlCl_3 + HCl$ -------




Spectre U. V. de : K
$CH_3OH + CH_3COONa$
$CH_3OH + CH_3COONa + H_3BO_3$
279
272
302
346
378
250
300
350
400

S U B S T A N C E F

Cette substance provient de la bande O5 qu'il est très difficile de distinguer dans un premier temps, de la bande 1, car ces deux bandes sont très rapprochées et donnent la même coloration orangée avec l'acétate basique de plomb. On arrive, cependant, à isoler la substance F par chromatographie sur W_1 avec l'acide acétique 5 %, puis avec l'acide acétique 10 %.

Les données que nous possédons sur cette substance sont encore fragmentaires :

Les spectres U. V. sont de type lutéoline-iorientine ce qui confirme l'indication du réactif à l'acétate basique de plomb.

Sous U. V. avant révélation, elle se détache en sombre, et le réactif de Bénédict ne fait pas apparaître de fluorescence jaune.

Elle n'est pas modifiée par hydrolyse alcaline.

Nous n'avons pas fait d'hydrolyse acide sur la substance F elle-même, mais nous avons isolé cette substance à partir des lixiviats hydrolysés et non hydrolysés. Elle ne semble pas exister en plus grande quantité après hydrolyse.

Comportement chromatographique : sur W_{20} avec l'acide acétique 5 % le Rf de la substance F est très proche de celui d'une isoorientine témoin, et assez différent de celui de la substance A (= Lucénine).

Rf rut

W_{20} - AA_5

Substance F = 0,52

Isoorientine = 0,49

Substance A = 0,70

Rf rut — Substance F = 0,78

W_1 - AA_{15} — Substance A = 0,87

Mais sur gel de silice H avec A. P. E. M., la substance F migre dans la zone des di-C-glycosides :

Rf substance F = 0,19

substance A = 0,16

substance B = 0,10 (triglycoside)

isoorientine = 0,45

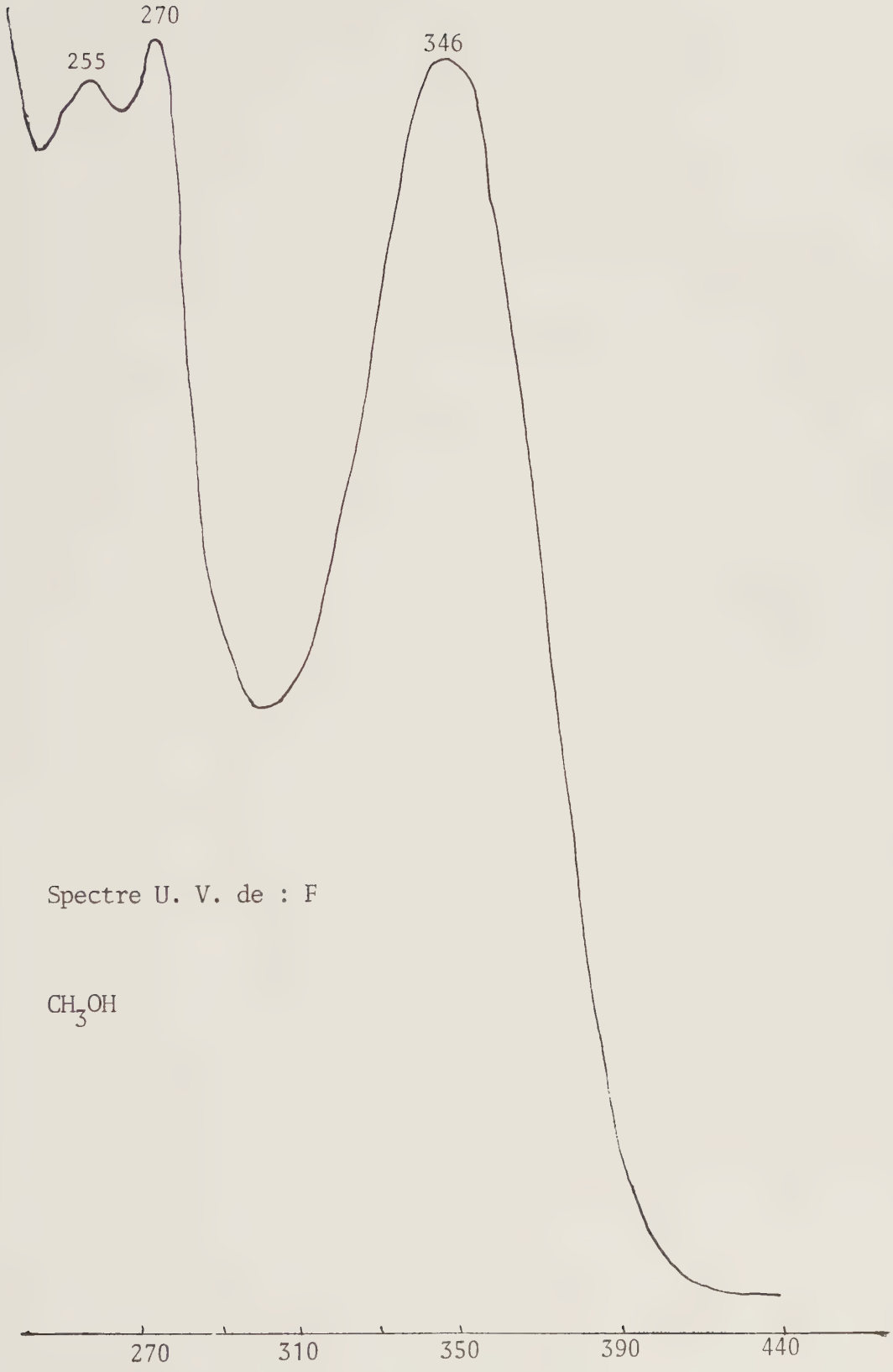
Il faut signaler que lors de la purification de la substance B, sur W_1 avec AA_5, on sépare des traces de substance F.

Nous ne savons pas si cette substance existe à l'état natif dans la drogue, ou si elle prend naissance à partir d'un autre flavonoside.

S'il s'agit bien d'un di-C-glycoside de lutéoline, nous ignorons s'il provient de l'isomérisation de la substance A, mais nous pouvons dire que nous n'en avons pas décelé après chauffage en milieu acide de cette substance.

D'après la résistance de cette substance à l'hydrolyse acide, son comportement chromatographique, (à la limite des mono-C-glycoside sur W_{20} avec AA 5 % ; dans la région des di-C-glycosides par CCM gel Si H avec APEM), les réactions colorées qu'elle donne avec l'acétate basique de plomb et le réactif de Bénédict, la comparaison de ses spectres U. V. avec ceux de l'orientine, de l'isoorientine et de la lucénine, on peut dire que :

la substance F est un C-glycoside de lutéoline.



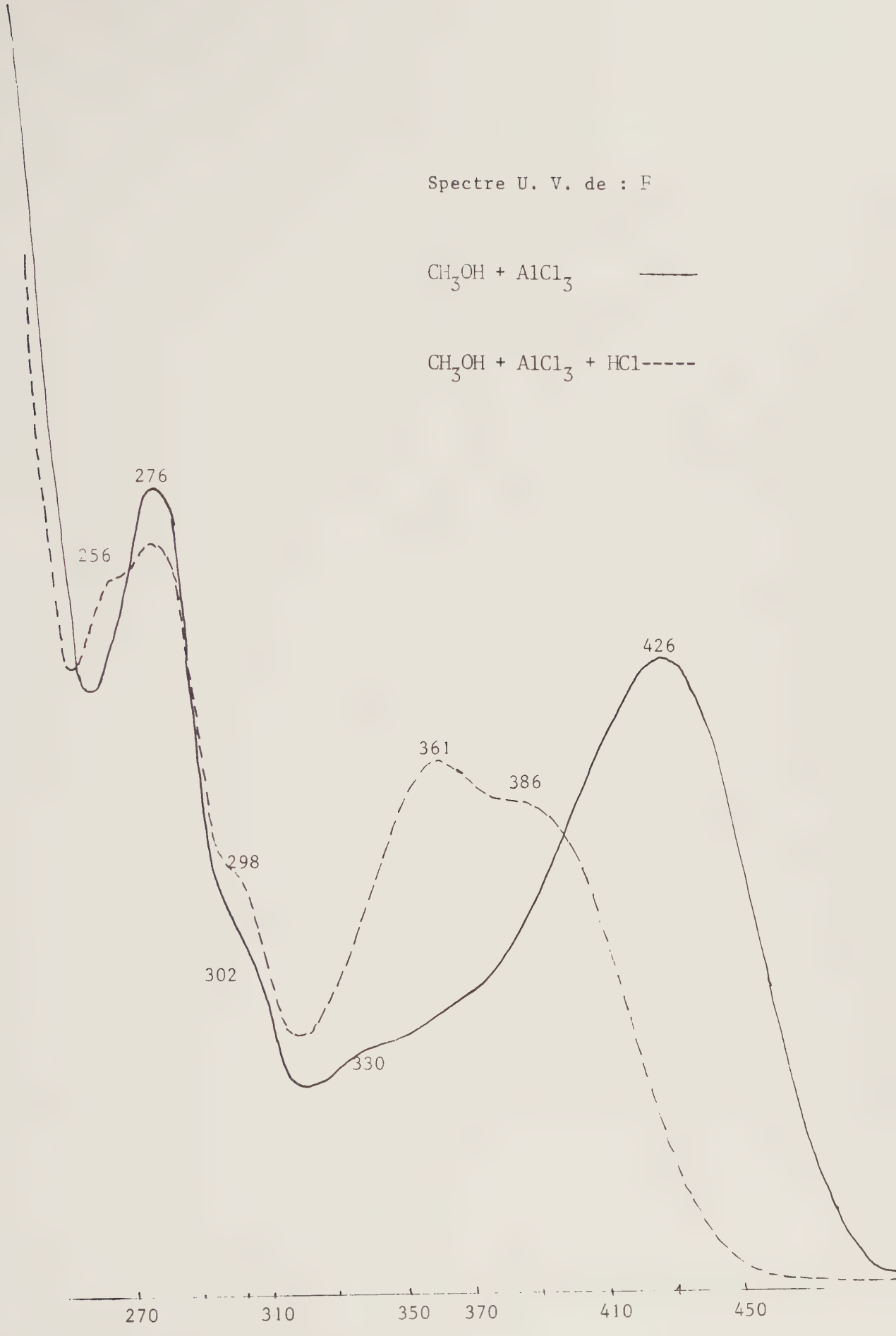
Spectre U. V. de : F

CH_3OH

Spectre U. V. de : F

$CH_3OH + AlCl_3$ ——

$CH_3OH + AlCl_3 + HCl$-----



Spectre U. V. de : F

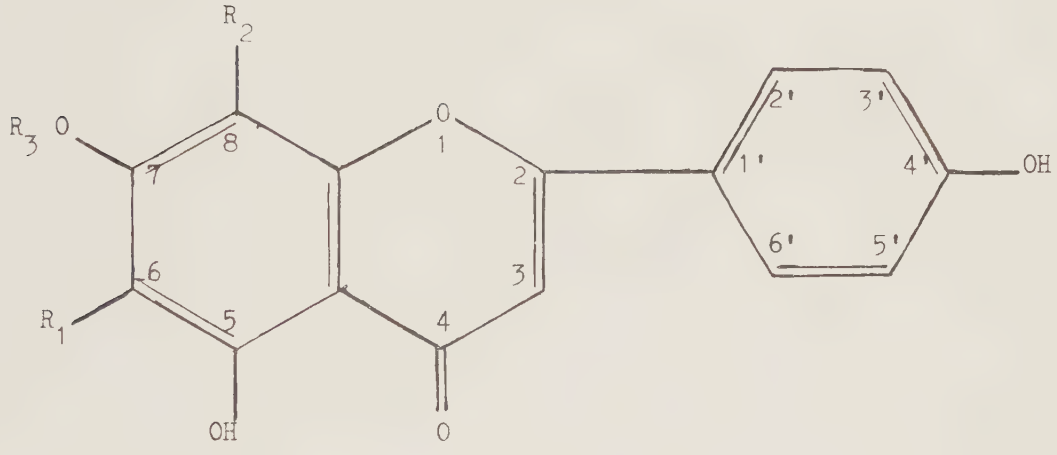
$CH_3OH + CH_3COONa$

T A B L E A U XXIX : C-flavonosides présents chez *Spergularia rubra* (L.) J. et C. Presl (plante entière sèche)

	Dérivés de la lutéoline			Dérivés de l'apigénine				
	F	A	B	Z	X	Y	G	K
O-glycosides de di-C-glycosides			4' ou 3' glucoside de lucénine (?) : B			Z : ester ferulique d'une O-glycosylvicenine		
			H^+ - glucose	OH^- - acide férulique				
Di-C-glycosides		Lucénine$_2$ (?) A		Z' - sucre	X : Di-C-glucosyl-6,8 Apigénine			
				H^+				
O-glycosides de Mono-C-glycosides						Y : 7 O-glucoside de 6 ou 8 glycosylapigénine		
	F : mono ou di-C-glycosyl lutéoline			- glucose		H^+		
Mono-C-glycosides							G { 6 ou 8 glycosyl apigénine	K { 6 ou 8 glycosyl apigénine

N. B. : Les racines de *Spergularia rubra* ne contiennent pas de composés flavoniques.

C-glycosides de Sp. rubra dérivant de
l'apigénine (trihydroxy-5, 7, 4' flavone)



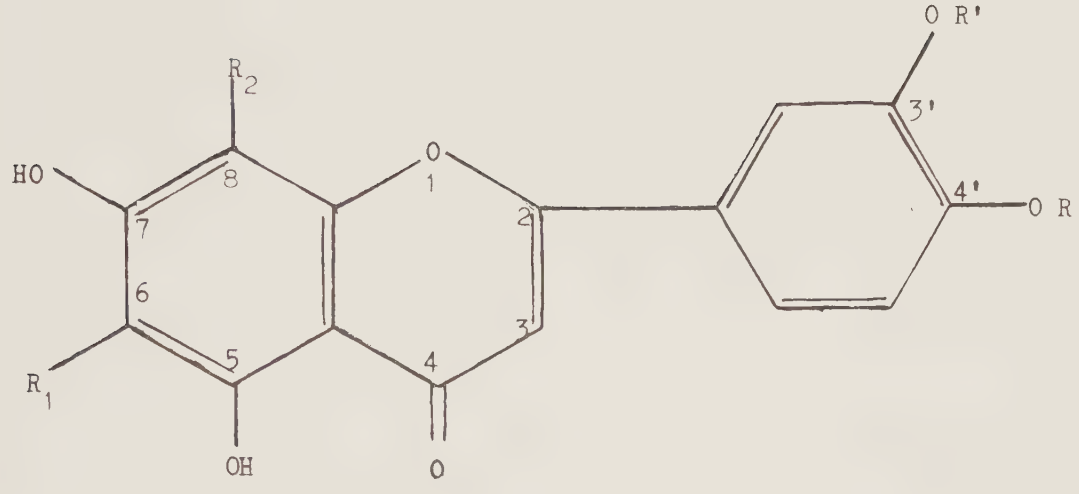
	R_1	R_2	R_3	
	H	H	H	Apigénine
soit	H	ose	H	Substance G et K
soit	ose	H	H	
soit	H	ose	glucose	Substance Y
soit	ose	H	glucose	
	ose	ose	ose acylé p. ac. férulique *	Substance Z
	glucose **	glucose **	H	Substance X

* Il est possible que l'ose acylé soit fixé en 4'.

** β-D-glucopyranosyl.

C-glycosides de Sp. rubra dérivant de

la <u>lutéoline</u> (tétrahydroxy-5, 7, 3', 4' flavone)



	R_1	R_2	R	R'	
	H	H	H	H	Lutéoline
soit	H ou ose	ose	H	H	Substance F
soit	ose	H ou ose	H	H	
soit	ose	ose	H	glucose	Substance B
soit	ose	ose	glucose	H	
	ose	ose	H	H	Substance A

Le tableau XXIX indique l'état de nos connaissances sur la composition en flavonoïdes de *Spergularia rubra*. Ces composés flavoniques sont ceux présents dans la drogue, c'est à dire dans la plante aérienne entière plus ou moins fleurie séchée sans précautions spéciales. Nous n'avons pas décelé de composés flavoniques dans les racines que nous possédions, appartenant à la plante en provenance du Maroc, ce qui est conforme à la littérature.

En dehors de très petites quantités d'aglucones libres (apigénine - lutéoline), la drogue contient donc essentiellement des glycoflavones dérivant de l'apigénine et de la lutéoline.

Les variations de teneur que nous avons observées, selon les lots, en produits fragiles de type O-hétéroside acylé de glycoflavone (substance Z) laisse supposer que les flavonosides de la plante fraîche sont beaucoup plus complexes que ceux isolés à partir de la drogue.

Cette hypothèse est confirmée par l'examen chromatographique effectué sur un échantillon de *Sp. rubra* donnée par le Jardin botanique de Dijon.

Examen rapide des flavonosides de la plante fraîche :

La plante, grossièrement coupée, est projetée aussitôt après ramassage dans le méthanol absolu bouillant (8 g de *Spergularia* dans 100 ml de méthanol). Après 30 minutes d'ébullition sous réfrigérant à reflux, on filtre à chaud ; la plante,

séchée à l'air libre, pulvérisée est lixiviée avec de l'alcool à 70^{C} selon notre technique habituelle : Alcool de stabilisation (st) et lixiviat (lix) évaporés, extraits à l'éther et au butanol, sont étudiés parallèlement (E. st) (B. st) (E. lix) (B. lix).

La phase butanolique obtenue à partir du lixiviat (B. lix) a été partagée en 3 parties ;

- la première est gardée comme témoin (lix. T)
- la deuxième est soumise à l'hydrolyse alcaline puis extraite à l'éther (lix. OH^- E) (lix OH^- eau)
- la troisième est hydrolysée en milieu acide N puis extraite à l'éther et au butanol (lix H^+ E) (lix H^+ B) (lix H^+ eau)

Toutes les fractions ont été analysées par chromatographie descendante sur Whatman n° 20 avec l'acide acétique à 5 %.

Certaines ont été chromatographiées sur CCM polyamide avec le 12/4/3/1 (E st. B st. E lix. lix.T.).

Enfin on a recherché les sucres dans (lix H^+eau) et les acides organiques dans les phases éthérées.

Résultats

La chromatographie CM sur polyamide 12/4/3/1 montre que les phases éthérées ne contiennent pratiquement que des acides organiques ; les phases butanoliques non hydrolysées, (B st. lix T), d'apparence semblable, ne laissent apparaître que les flavonosides de la zone IV. Cette zone, très importante, se colore en orangé, plus ou moins rouge vif par endroits, avec la solution d'acétate basique de plomb reprise dans l'alcool.

La chromatographie sur papier (W_{20} AA_5) confirme ces observations en les précisant.On a chromatographié parallèlement les solutions extractives obtenues à partir de *Sp. rubra* sèche, et des témoins des substances pures présentes dans la drogue.

Le tableau XXX résume les renseignements fournis par la chromatographie sur papier.

D'après ces résultats il semble que les flavonosides natifs seraient le plus souvent sous forme acylée.

L'existence de flavonosides complexes acylés est bien connu depuis l'identification du tiliroside dans les fleurs (HORHAMMER en 1959) et dans les feuilles (PARIS 1960) de *Tilia argentea*, puis dans les feuilles et les inflorescences de *Platanus occidentalis* par STAMBOULI et PARIS en 1961 (79). EGGER (60) signalait en 1964 que, dans de très nombreux cas, les flavonosides existaient dans les plantes sous forme d'esters d'acides hydroxycinnamiques ou d'acides hydroxybenzoïques, l'estérification ayant lieu avec l'hydrolxyle d'un sucre du flavonoside. Depuis, on a découvert d'assez nombreux flavonoïdes acylés. ALSTON (26) en a fait une revue en 1967. Ce type de composé serait fréquent chez les Lemnacées d'après les travaux de Mc CLURE et ALSTON, qui signalent, chez les plantes de cette famille, l'existence de dérivés acylés de vicénines et de lucénines (71). Récemment HERISSET (80) a identifié chez l'*Anthemis nobilis*, l'ester anthénobilique de l'apigénine 7-glucoside.

(79) STAMBOULI (A) et PARIS (R), 1961, A. P. F., 19, n° 12, 732-739

(80) HERISSET (A) et coll., Plantes méd. et Phyt., 1971, 5, n° 3, 234-239

T A B L E A U XXX : Flavonosides présents dans *Spergularia rubra* (Jardin Botanique Dijon) après stabilisation de la plante fraîche à l'alcool.

	Bande 4	Bande 4*	Bande 3	Bande 2	Bande 1	Bandes 05 03 02
avant hydrolyse acide B. st = B. lix	+ liséré jaune au dessus de Bande 4	+ + + + + rouge intense	+ + + + orangé	+ + jaune X	+ + orangé rouge A	0
après hydrolyse alcaline (lix. OH^- eau)	+ jaune	0	+ jaune	X + + + + jaune	A + + + + orangé rouge	0
après hydrolyse acide (lix. H^+ B)	0	+ + rouge violacé	+ + rouge violacé	+ + + + + jaune	+ + + + orangé rouge	0

- Appréciation des quantités + + + + + + + + + + + ± 0
- Les colorations indiquées sont celles obtenues avec l'acétate basique de plomb.

La présence de flavonosides acylés comme composés initiaux chez *Spergularia rubra* n'a donc rien d'exceptionnel. Mais la comparaison d'une plante fraîche d'origine bourguignonne, et d'une drogue en provenance d'Afrique du Nord, si elle donne des indications intéressantes, n'apporte pas une certitude. Nous avons l'intention de reprendre ce travail avec des *Spergularia rubra* poussant dans le Morvan ; nous pourrons ainsi étudier les flavonoïdes de la même plante stabilisée à l'alcool ou séchée à l'air libre sans précautions spéciales.

Sur la phase aqueuse résiduelle de l'hydrolyse acide de la plante stabilisée (lix H^+ eau) nous avons cherché à identifier les sucres par chromatographie selon les techniques déjà exposées. Nous avons identifié très nettement

du glucose

et du rhamnose.

Il ne semble pas y avoir d'autres sucres libérables par hydrolyse acide de la plante.

L'étude des acides libérés par hydrolyse alcaline sera particulièrement intéressante pour l'étude de la plante fraîche. Actuellement nous avons décelé dans ces essais préliminaires :

deux acides de type cinnamique :

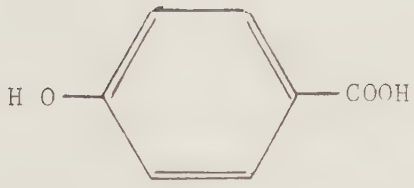
- l'acide férulique
- et l'acide caféique (?)

ainsi qu'un acide de type benzoïque ou parahydroxybenzoïque, en utilisant les techniques que nous allons brièvement exposer dans le chapitre suivant.

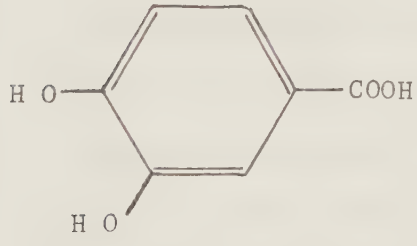
PRINCIPAUX ACIDES - PHENOLS EXISTANT CHEZ LES VEGETAUX

Principaux acides de la série benzoïque

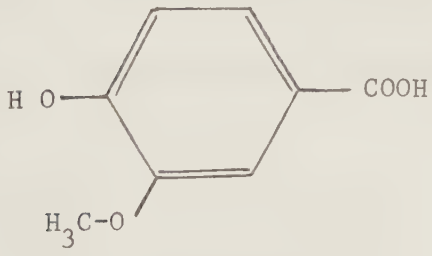
ac. benzoïque



ac. p. hydroxybenzoïque

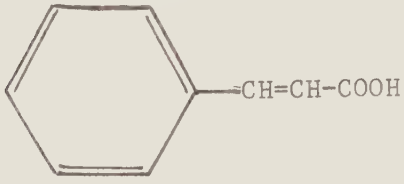


ac. protocatéchique

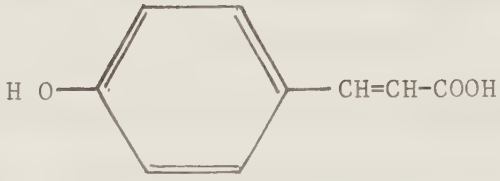


ac. vanillique

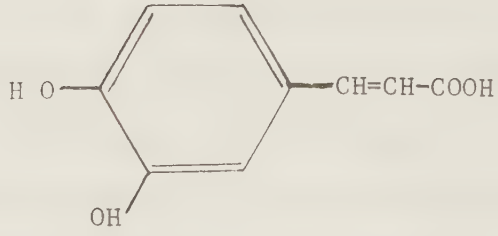
Principaux acides de la série cinnamique



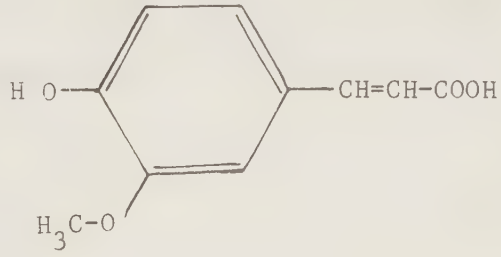
ac. cinnamique



ac. p. coumarique



ac. caféique



ac. férulique

D - INTRODUCTION A L'ETUDE DES POLYPHENOLS NON FLAVONIQUES DE *SPERGULARIA RUBRA*.

I Pigments anthocyaniques.

On trouve chez *Sp. rubra* des pigments roses, qui appartiennent bien au groupe des anthocyanes et non à celui des βcyanines. Nous nous en sommes assurés en effectuant une électrophorèse dans les conditions indiquées par MABRY (31). La migration se fait bien vers la cathode.

Nous n'avons pas cherché à extraire sélectivement les anthocyanes, nous les avons obtenus en passant sur colonne de polyamide le résidu aqueux du lixiviat épuisé par l'éther et par le butanol, pour vérifier si l'extraction des flavonosides avait bien été complète. De l'eau passée sur la colonne a enlevé des substances fortement colorées en marron jaune ; puis de l'alcool à 10 % a extrait des traces de flavonosides ; enfin l'alcool à 60 ° a élué les anthocyanes sous forme d'une bande rouge violacé très nette.

Cette fraction rouge, a été évaporée, reprise par l'eau, hydrolysée 30 minutes au bain marie bouillant en milieu chlorhydrique 2N. Les anthocyanidines libérées ont été extraites par l'alcool isoamylique.

Après évaporation et reprise du résidu par l'alcool, nous avons effectué la réaction indiquée par RIBEREAU GAYON (64) pour savoir si le composé isolé possède un groupement orthodihydroxylé libre sur le noyau latéral. La coloration rose inchangée en présence de chlorure d'aluminium prouve que le composé ne possède pas un tel groupement.

Le spectre U. V. dans l'alcool contenant 0,1 % d'HCl a bien montré un maximum vers 541 nm mais la substance n'était pas assez pure pour permettre une identification valable.

II Acides organiques.

Nous avons essayé d'étudier les acides organiques présents dans les phases éthérées totales, dans la fraction extraite par une solution de bicarbonate, et enfin ceux qui étaient restés dans la phase butanolique.

A partir de ces solutions nous avons isolé les acides organiques ; les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant la chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1, avec l'acide acétique à 15 % ou à 30 % selon les cas ; nous avons également, comme pour les aglucones, effectué successivement dans le même sens une migration avec l'acide acétique à 5 % puis avec l'acide à 30 %.Après le développement par AA 5 % , le chromatogramme est séché

et on découpe les bandes (bleues sous U. V. en présence d'ammoniaque) qui correspondent aux acides se déplaçant rapidement dans ces conditions. La deuxième migration avec AA 30 %, fait migrer des bandes bleu foncé, bleu turquoise, ou vert jaune en présence d'ammoniaque, qui sont fortement imbriquées avec les bandes des aglucones.

Les spectres réalisés sur les éluats, ne nous ont pas donné de bons résultats, la séparation flavonoïdes-acides organiques étant défectueuse.

Les chromatographies en présence d'acides organiques de référence n 'ont pas été satisfaisantes pour les corps isolés après la deuxième migration avec AA_{30}.

Dans les conditions où les acides témoins migrent correctement, nos substances restent sur la ligne de départ. Si on modifie les solvants pour que nos substances se déplacent, les témoins vont tous au front du solvant.

Les seuls résultats convenables ont été obtenus avec les acides découpés après migration dans AA_5, ou avec les phases éthérées de lavage ou d'hydrolyse des flavonosides déjà purifiés.

Ces acides ou ces mélanges d'acides ont été identifiés

1°) par chromatographie sur CM de cellulose

avec AA 2 % ou AA 15 %

ou

avec HCl 0,1 N selon PARIS (53)

2°) par chromatographie sur papier W n°1 avec AA 5 %

3°) par chromatographie sur papier W n°1 avec le solvant de Partridge

4°) par chromatographie bidimensionnelle sur CM de cellulose

avec HCl 0,1 N dans un sens

AA 15 % dans l'autre sens.

Comme révélateur nous utilisons le réactif de Swain modifié, indiqué par PARIS (53) et HERISSET (80) (paranitraniline diazotée). En plus de l'acide férulique qui estérifiait la substance Z, nous avons trouvé de l'acide férulique libre, et de l'acide paracoumarique et enfin un acide dont la coloration avec la paranitraniline et les Rf sont ceux de l'acide vanillique dont nous ne possédions pas encore de témoin. Nous avons caractérisé un acide qui présentait le comportement chromatographique et les colorations d'un acide hydroxybenzoïque.

Ce travail sur les acides organiques sera repris avec l'étude de la plante fraîche.

TROISIEME PARTIE

ESSAIS PRELIMINAIRES A UNE ETUDE PHARMACOLOGIQUE

Un certain nombre de pigments flavoniques sont utilisés en thérapeutique, purs, ou la plupart du temps sous formes d'extraits végétaux plus ou moins purifiés.

Les propriétés vitaminiques P de divers flavonols et de leurs hétérosides, isoquercitroside, astragaloside, hypéroside et surtout rutoside extrait des boutons floraux de *Sophora japonica* et des feuilles d'*Eucalyptus macrorrhyncha* sont les plus anciennement connues, et les plus utilisées en thérapeutique. Mais les propriétés physiologiques des composés flavoniques sont multiples et d'après PARIS (81) variables avec la catégorie (flavones, flavonols, flavanones, chalcones, isoflavones) à laquelle ils appartiennent.

Les effets antispasmodiques de flavones dérivées de l'apigénine et de la lutéoline, ont été étudiés par HORHAMMER, qui a constaté que les glucosides étaient plus actifs que les aglycones (82). Le 7 glucoside de l'apigénine (cosmosioside) et le 7 glucoside de la lutéoline, identifiés par CHAUMONT (83) et HERISSET (84) dans les capitules d'*Anthemis nobilis* sont, de plus, antiinflammatoires.

(81) PARIS (R) et MOURY (J), A.P.F., 1964, 22, n° 8-9, 489-493

(82) HORHAMMER (L), Ber. XXI, Internat.Kongress Pharmaz. 1961
cité par GERLACH (H) (85)

(83) CHAUMONT (J.P) Pl. méd. et Phyt., 1969, 3, 167-174

(84) HERISSET (A) et coll. Pl. méd. et Phyt., 1970, 4, 189-200

Les flavonoïdes de la racine de *Glycyrrhyza glabra* possèdent une activité antispasmodique et antiulcère gastrique étudiée par PARIS. Selon GERLACH (85), la liquiritigénine présente une activité qui atteint le quart de celle de la papavérine, et l'activité de l'isoliquiritigénine, chalcone isomère de la flavanone précédente, serait la moitié de celle de cet alcaloïde.

Une autre propriété connue est l'action diurétique. Le myricitroside de *Cercis siliquastrum*, et le rubinoside de *Melilotus alba*, la morine, les flavonoïdes de la Digitale ont une activité diurétique prouvée. Mais les flavonoïdes isolés sont généralement moins actifs que les extraits végétaux ou que les plantes elles-mêmes où des substances accompagnatrices agissent en synergie.

L'étude systématique de l'effet cholérétique de divers glycosides de flavonols ou de flavanones (rutoside - quercitroside - citroflavonoïdes) a été entreprise par BEZANGER-BEAUQUESNE (86).

Cette brève revue de l'activité pharmacologique des dérivés flavoniques montre que, jusqu'à présent, on possède peu de renseignement sur les propriétés physiologiques des C-flavonosides. Il est vrai que ces composés ne sont vraiment connus et étudiés que depuis une dizaine d'années, et que les quantités isolées sont généralement trop faibles pour que l'on puisse en arriver au stade de l'étude pharmacodynamique.

(85) GERLACH (H) Pharmaz. Zentr., 107, n° 10, 714-722

(86) BEZANGER-BEAUQUESNE (L) C.R Soc. Biol., 1965, 158, n° 11, 2095-2100

Néanmoins on attribue à une C-glyco-flavone, le lespecapitoside, découvert par PARIS chez *Lespedeza capitata* (87) et reconnu par le même auteur identique à l'isoorientine (88), les propriétés physiologiques de cette plante qui possède 3 actions principales : diurétique, hypocholestérolemiante et hypoazotémique. Mais l'activité diurétique étudiée par JACOB (89) ne semble pas être importante dans le cas du lespécapitoside isolé utilisé en thérapeutique.

Signalons enfin que l'on a aussi attribué à un C-hétéroside le Scoparoside (C-glucosyl-8-méthyl-3' lutéoline) l'action diurétique des fleurs du Genêt à balai *Sarothamnus scoparius* (90), mais ce point a été contesté.

(87) PARIS (R) et coll. C.R. Acad. Sc. Paris. 1962, 254, 2, 352-353

(88) PARIS (R) et coll. C.R. Acad. Sc. Paris. 1964, 258, 6003-6005

(89) JACOB et coll. Information thérapeutique. 1963, 6, 19 cité par CALO et coll. Boll. Chim. Farm., 1969, 108, 587-593

(90) MASCRE (M) PARIS (R) C.R. Acad. Sc. 1937, 204, 1270-1271 ; 1581-1583
Bull. Soc. pharmacol., 1937, 44, 401-415

Partie expérimentale

Les essais que nous avons réalisés doivent être considérés seulement comme des essais préliminaires.

Ils ont été effectués, d'une part, sur un nébulisat (N) préparé à partir d'un décocté aqueux de *Spergularia rubra* (1g nébulisat = 10g de plante), d'autre part sur un extractum préparé par une technique analogue à celle utilisée pour isoler les flavonosides, mais simplifiée.

La plante, réduite en poudre, dégraissée, est lixiviée par l'alcool à 70°. On chasse l'alcool, on extrait à l'éther. La phase aqueuse restante est évaporée au maximum ; on s'arrête avant que le résidu ne devienne trop sirupeux. On passe sur colonne de polyamide. On commence par éluer à l'eau qui enlève une grande partie des impuretés avant d'entrainer les flavonosides très glycosylés ; on ne prolonge pas l'extraction par l'eau et on passe directement à l'alcool à 30 % qui élue en bloc la majeure partie des flavonosides que l'on achève d'extraire par l'alcool à 60 %.

Les solutions hydro-alcooliques, évaporées constituent l'extractum (E) étudié. Cet extractum contient pratiquement les hétérosides totaux de *Spergularia rubra*. Ces flavonosides sont dosés par la méthode spectrophotométrique décrite précédemment.

1 - Essai de toxicité aigüe.

L'extractum E ayant été dissous dans du soluté isotonique de chlorure de sodium, 10 souris albinos pesant 20g ont reçu par sonde gastrique, dans un volume de 25 ml/kg, une quantité d'extractum correspondant à 250 mg/kg de flavonosides ;

10 autres souris ont reçu de la même manière 500 mg/kg de flavonosides. Les souris du premier lot ont toutes survécu ; celles du second lot sont toutes mortes.

La DL 50 est donc situé entre 250 et 500 mg/kg (exprimé en flavonosides).

2 - Action diurétique.

Nous avons recherché l'action diurétique du nébulisat (N) et de l'extractum (E) de *Spergularia rubra*, et l'avons comparée à celle du rutoside (R) et à celle d'un produit spécialisé présenté comme diurétique doux et surtout antiurémique et anticholestérolémique, constitué par les C-flavonosides d'un extrait aqueux lyophilisé de *Lespedeza capitata* (L.).

La technique utilisée était la suivante :

Des rats, à jeun depuis dix huit heures, sont placés dans des cages à métabolisme où ils restent pendant toute la durée de l'expérience sans eau ni nourriture. Les animaux témoins reçoivent par voie buccale 2 ml/100 g d'une solution à 8 pour mille de chlorure de sodium ; les animaux à l'essai reçoivent dans les mêmes conditions une dose convenable du produit essayé dissous dans la solution salée. On mesure le volume d'urine excrété au bout de cinq heures par les animaux témoins et par les animaux traités. L'activité diurétique est exprimée par le rapport :

$$\frac{\text{volume d'urine excrété par les animaux traités}}{\text{volume d'urine excrété par les animaux témoins}}$$

Dans nos essais, nous avons uniformément traité les rats avec une quantité de produit correspondant à 20 mg/kg de flavonoïdes (exprimés en rutoside), chaque lot de rats comprenant 10 animaux.

Les résultats suivants sont exprimés en ml d'urine excrétés en 5 heures par rat :

Témoin	R	L	E	N
1,35	1,30	1,30	2,20	5

Rutoside et flavonosides de *Lespedeza capitata* ne manifestent aucune action diurétique, l'extractum purifié de *Spergularia rubra* a une activité diurétique de $\frac{2,20}{1,35} = 1,6$; le nébulisat une activité diurétique de $\frac{5}{1,35} = 3,7$, ce qui laisse entendre que l'action diurétique de *Spergularia rubra* est due à un ensemble dont les C-flavonosides ne constituent qu'une partie.

A ce point de vue, *Spergularia rubra* n'est donc pas différente des autres drogues à flavones possédant une action diurétique (*Herniaria glabra* - *Solidago virga aurea* - racines d'*Ononis repens* (85)). Il était pourtant séduisant de penser que dans une famille de composés chimiques reconnus pour être plus actifs sous forme d'hétérosides, ceux de ces hétérosides résistant à l'hydrolyse possédaient une action particulièrement intense et prolongée.

CONCLUSION

On peut dire que la Sabline rouge, petite Caryophyllacées des terrains sableux, dont les propriétés diurétiques, antilithogènes, antispasmodiques, sont utilisées en médecine populaire dans le traitement des affections de la vessie, coliques néphrétiques, cystite, gravelle, mérite de retenir notre attention à divers autres points de vue.

En effet l'étude de cette plante pose au départ un problème d'identification botanique. La drogue est toujours connue et vendue en herboristerie sous le nom d'*Arenaria rubra* que lui donna LINNE. Nous avons montré que la Sabline rouge appartient bien au genre *Spergularia* où la rangèrent les botanistes J et C PRESL, après que PERSOON eut décrit ce genre *Spergularia* non individualisé par LINNE. La présence de feuilles stipulées, d'un fruit capsulaire s'ouvrant jusqu'à la base par trois valves, l'existence de formations libero-ligneuses tertiaires dans le parenchyme cortical secondaire de la racine, suffisent à prouver que la Sabline rouge doit être classée parmi les plantes du genre *Spergularia*.

Nous avons montré également l'importance de l'examen des graines avec recherche des graines ailées, si l'on veut s'assurer que la drogue est bien constituée par *Spergularia rubra*, et non par des espèces voisines.

Après un examen rapide des divers constituants chimiques de la drogue, nous avons été amené à nous consacrer à l'étude des composés flavoniques de *Spergularia rubra*. Bien que l'on puisse attribuer à ces corps une partie de l'action physiologique, ce n'est pourtant pas à ce titre que les flavonoïdes de *Spergularia rubra* méritent une étude approfondie.

Il s'agit en effet, exclusivement, de flavonosides non hydrolysables bâtis sur l'apigénine et sur la lutéoline. Si certains des C-flavonosides de *Spergularia rubra* sont des mono-C-glycosides de type connus, la plupart sont des composés originaux, di- ou triglycosylés parfois acylés. Or on ne connait l'existence des di-C-flavonosides que depuis les travaux de HORHAMMER et SEIKEL en 1965, et la connaissance de dérivés complexes glycosylés et acylés de ces di-C-glycosides est encore plus récente.

Mais la nature de tels composés qui présentent des caractères de solubilité très particuliers, empêche d'utiliser avec succès les techniques classiques d'isolement et d'étude des composés flavoniques. Il nous a donc fallu rechercher les meilleurs procédés pour extraire l'ensemble des C-flavonosides de la plante, pour les fractionner et les isoler à partir des liqueurs extractives, et enfin pour les purifier. Toutes ces opérations sont rendues très délicates par la présence des flavonosides complexes extrêmement fragiles ; il faut utiliser des papiers à chromatographie lavés préalablement avec une solution d' EDTA puis soigneusement rincés à l'eau, séchés et enfin lavés à l'alcool ; pour certains composés, toutes les évaporations doivent se faire à froid, sous azote ou sous vide phosphorique, de

préférence à l'obscurité.

Nous avons dû également mettre au point des méthodes d'analyse et de dosage pour contrôler le déroulement des diverses opérations d'extraction et d'isolement.

L'étude des divers C-flavonosides isolés a été faite avant et après hydrolyse alcaline et acide. L'identification du squelette flavonique a été assez facile, grâce à l'examen des spectres U. V. dans le méthanol seul et en présence de divers réactifs ; nous avons également déterminé ainsi quels étaient les hydroxyles osidifiés par des sucres , et l'identification de ces sucres séparables par hydrolyse acide a été simple ; mais la détermination de la place et surtout de la nature des divers oses fixés directement sur le noyau flavonique a posé des problèmes très difficiles à résoudre.

En plus des problèmes complexes habituels à ce genre de composés dont la dégradation très difficile demande des quantités de substance souvent impossibles à isoler à cause de leur très faible pourcentage dans la plante (quelques milligrammes par kilogramme de plante pour certains), les C-flavonosides de *Spergularia rubra* posent des problèmes particulièrement difficiles. Le fait qu'il s'agisse pour la plupart de produits originaux empêche de mener parrallèlement une étude avec des substances de référence. L'examen du comportement chromatographique, des réactions colorées, des spectres I. R., ne peut être fait que comparativement à des corps de constitution voisine, ce qui ne permet pas toujours d'arriver à une certitude.

Nous avons néanmoins reconnu la présence de composés de type vitexine et orientine, sans pouvoir encore préciser la nature de l'ose fixé sur le noyau.

Seule, également, la nature de l'ose fixé directement sur le noyau, empêche que soit connue totalement la structure de la substance Y, qui est un 7-O-glucoside de mono-C-glycosyl 6 (ou 8) apigénine, c'est-à-dire un composé de type saponarine.

Nous avons identifié avec certitude un di-C-glycoside du type vicénine 2 de SEIKEL. Il s'agit de la di-C-glucosyl-6,8 apigénine (substance X) dont le comportement chromatographique et le spectre I. R. sont semblables à ceux du produit de référence synthétisé par CHOPIN, et isolé du Citron par le même auteur.

Nous avons également isolé un di-C-glycoside de lutéoline (substance A) que son absence apparente d'isomérisation par chauffage en milieu acide, son comportement chromatographique, son spectre I. R. voisin mais non identique à ceux des lucénines 1 et 3, peuvent faire considérer comme un composé de type lucénine 2 de SEIKEL. L'absence de produits de référence ne permet pas de préciser la nature du sucre fixé en C_6 et en C_8.

D'assez nombreux flavonosides de ce type sont actuellement connus. En dehors des vicénines et des lucénines de *Vitex lucens*, premiers composés isolés, on en a trouvé chez des plantes inférieures, algues vertes, *Mnium* (91), chez les céréales (92), dans

(91) MELCHERT (T.E.) et ALSTON (R.E.). Science, 1965, 150, 1170-1171
(92) KING (H.G.C.) J. Food Sci., 1962, 27, 446-454

le thé vert (93), le lin (94), les citrus, chez *Viola tricolor* (95) (69), *Silene schafta* (49) *Silene conica* (50), chez des Composées (Tragopogon. 78) des Légumineuses (*Psoralea*. 73) et chez les Lemnacées.

Dans les plantes de cette famille les di-C-glycosides sont étudiées du point de vue de la biosynthèse et de la chimiotaxonomie par l'équipe de Mc CLURE, ALSTON, MABRY etc...

Cette famille des Lemnacées contient en outre des dérivés acylés de glycoflavones (71) du type de notre substance Z, alors que *Linum usitassimum* et les *Psoralea* renferment des dérivés O-glycosylés de di-C-flavonosides comme notre substance B.

Il est nécessaire de confirmer la structure des substances B et Z par diverses vérifications, néanmoins nous avons déjà montré que la substance B est un dérivé O-glycosylé en 4' (ou 3') de la di-C-glycosyl-6,8 lutéoline (substance A) et que la substance Z est un dérivé glycosylé et acylé (par l'acide férulique) de la di-C-glucosyl-6,8 apigénine (substance X).

Qu'un tel dérivé subsiste encore dans la plante séche confirme les premières observations que nous avons faites sur un minime échantillon de plante fraîche : les examens chromatographiques montrent en effet que la majorité, sinon tous les flavonosides de *Spergularia rubra*, existent à l'état natif sous forme acylée.

La présence de di-C-flavonosides complexes chez *Spergularia rubra* est d'autant plus intéressante que nous avons

(93) SAKAMOTO (Y.) Agr. Biol. Chem. 1970, 34, n°6, 919-925
(94) IBRAHIM (R.K.) Biochim. Biophys. Acta, 1969, 192, 549-592
(95) HORHAMMER (L.), WAGNER (H.), ROSPRIM (L.), MABRY (T.), ROSLER (H.), Tetrahedron letters, 1965, n°22, 1707-1711

retrouvé des composés très comparables dans toutes les Caryophyllacées indigènes de la sous-famille des Alsinoïdées, dont nous avons fait une brève revue (*Cerastium arvense* - *Cerastium vulgatum* - *Cerastium tomentosum*- *Stellaria media* - *Stellaria holostea* - *Arenaria serpyllifolia* - *Arenaria rotundifolia*)

Nous nous proposons d'examiner à ce point de vue les diverses Silénoïdées où nous avons déjà caractérisé des C-flavonosides analogues à la saponarine. (*Lychnis dioïca* - *Lychnis flos cuculi* - *Lychnis sylvestris* - *Saponaria ocymoïdes* - *Silene inflata* - *Silene armeria*).

Ainsi l'étude des flavonosides de *Spergularia rubra*, qui apporte déjà des éléments nouveaux permettant une meilleure connaissance des composés encore peu étudié que sont les di-C-flavonosides, pourra peut-être nous conduire à une étude chimio-taxonomique des Caryophyllacées fondée sur la nature des C-flavonosides présents dans ces plantes.

SOLVANTS DE CHROMATOGRAPHIE UTILISES :

I - POUR LES FLAVONOIDES ET LES ACIDES ORGANIQUES

Sur papier Whatman n°1 ou n°20.

Solvant de Partridge (en volumes)

Butanol 4

Acide acétique .. 1

Eau 5

On utilise la phase supérieure du mélange après y avoir ajouté encore 1 p. 100 d'acide acétique pour empêcher les démixions.

B. E. W. (en volumes)

Butanol 5

Ethanol 4

Eau 2,2

Butanol acétique 27 % (en volumes)

Solution aqueuse à 27 % d'acide acétique)
) ãa
Butanol)

T. B. A. (en volumes)

Butanol tertiaire ... 3

Acide acétique 1

Eau 1

Estérification faible, contrairement au S. de Partridge.

Acide acétique dilué (sur papier ou C. M. cellulose)

(Acide acétique 2ml
(= AA 2
(Eau q.s.p. 100ml

(Acide acétique 5ml
(= AA 5
(Eau q.s.p. 100ml

(Acide acétique 10ml
(
(Eau q.s.p. 100ml

(Acide acétique 15ml
(
(Eau q.s.p. 100ml

(Acide acétique 30ml
(
(Eau q.s.p. 100ml

Acide chlorhydrique 0,1 N

Surtout sur C. M. cellulose.

II - POUR LES FLAVONOIDES

1 - sur C. M. de polyamide

Solvant de Egger type : 13/3/3/1 en volumes (pour hétérosides)

Eau 13

Ethanol 3

Méthyl-éthylcétone .. 3

Eau 1

Solvant de Egger modifié : 12/4/3/1 en volumes (pour hétérosides)

Eau 12
Ethanol 4
Méthyl-éthylcétone .. 3
Eau 1

Solvant de Egger dit "apolaire" (en volumes)

Benzène 60
Méthanol 20
Méthyl-éthylcétone .. 20
Acide acétique 1

2 - sur C. M. de gel de silice H.

a - pour hétérosides

A. P. E. M. (solvant de Chopin) (en volumes)

Acétate d'éthyle 80
Pyridine 12
Eau 10
Méthanol 5

A. A. E. M. (en volumes)

Acétate d'éthyle 80
Ammoniaque (en sol. conc. à 27%) ... 3
Eau 20
Méthanol q.s. une seule phase.

B. A. F. E. (en volumes)

Butanone 30

Acétate d'éthyle .. 50

Acide formique 10

Eau 10

b - pour aglucones

Toluène 40

Chloroforme 25

Acétone 35

Acide acétique 1

Benzène 72

Pyridine 18

Acide formique 12

Toluène 8

Acétate d'Ethyle .. 6

Méthanol 1

III - POUR LES OSES

1 - sur C. M. de Kieselguhr G.

n. Butanol ..... 40)
Acétone ..... 50) en vol.
Tampon phosphate à pH 5 ..... 10)

2 - sur Papier Whatman n°1

Solvant de Partridge cf. plus haut.

Acétate d'éthyle 20

Pyridine 10

Eau 20

Butanol 60

Pyridine 40

Eau 30

REACTIFS UTILISES POUR LA REVELATION DES CHROMATOGRAMMES

I - Révélation des Flavonoïdes.

Réactif au Chlorure d'Aluminium

pour Spray :

($Al Cl_3$ ..... 1 g
(Ethanol à 95° ..... 100 ml

pour dosage spectrophotométrique :

($Al Cl_3$ ..... 5 g
(Méthanol absolu Uvasol .... 100 ml

Réactif à l'oxychlorure de Zirconium

($Zn O Cl_2, 8 H_2O$ ..... 2 g
(Méthanol à 95° ..... 100 ml

Réactif de Bénédict (pour détection des groupements orthodiphénoliques.)

Dissoudre à chaud, dans 850 ml d'eau environ,

(Citrate de Sodium ..... 175 g
(Carbonate de Sodium anhydre ... 100 g

Dissoudre d'autre part, dans 100 ml d'eau,

(Sulfate de Cuivre ..... 17,3 g

Ajouter lentement, en agitant, la solution cuivrique dans la soluti de citrate.

Après refroidissement, compléter à 1 000 ml.

Réactif à l'acétate basique de Plomb

1 - Soluté d'acétate basique de Plomb de la Pharmacopée française. éd. 1965, p. 1040.

(Acétate neutre de Plomb pulvérisé ..... 300 g
(
(Oxyde de Plomb pulvérisé ..... 100 g
(
(Eau ..... 700 g

Ajouter de temps en temps jusqu'à dissolution complète.

2 - Evaporer 100 ml de la solution précédente jusqu'à environ 10 ml. Ajouter 90 ml d'alcool éthylique à 90^{C}.

Agiter avant utilisation.

Ainsi préparé ce réactif peut être utilisé sur C. M. de polyamide.

II - Révélation des oses.

Réactif au Naphtorésorcinol

(Solution alcoolique à 0,2% de Naphtorésorcinol .... 100 ml
(
(Acide phosphorique à 85% ..... 10 ml

Après pulvérisation du réactif, chauffer 5 à 10 minutes à 1'étuve à 100°, 105°.

Réactif au Phtalate d'Aniline

Dissoudre dans 100 ml de n. Butanol saturé d'eau :

(Aniline ..... 0,93 g
(
(Acide orthophtalique .... 1,66 g

Après pulvérisation du réactif, chauffer 10 minutes à 1'étuve à 105°.

III - Révélation des Acides organiques.

Réactif de SWAIN modifié par PARIS et HERISSET (Paranitraniline diazotée).

Sol. A : Solution de paranitraniline à 0,50% dans H Cl 2N

Sol. B : Solution aqueuse de nitrite de sodium à 0,5%

Sol. C : Solution aqueuse d'acétate de sodium à 20%

Sol. D : Solution aqueuse de carbonate de sodium à 15%

Mélanger avant emploi :

1,5 ml Sol. A + 0,5 ml Sol. B. + 20 ml Sol. C.

Pulvériser le mélange sur le chromatogramme.

Dans un deuxième temps, après séchage du chromatogramme, pulvériser la solution D.

BIBLIOGRAPHIE

Références

ALSTON (R.E.) - Chemotaxonomy or biochemical systematics ? in Comparative phytochemistry. Ed. SWAIN (T.). Acad. press London, New-York, 1966, chap. 3, 33-56 25

ALSTON (R.E.) - C-glycosyl flavonoids in Recent advances in phytochemistry. Vol. 1. Ed. MABRY (T.J.). Appleton century Crofts New-York, 1968, chap. 9, 305-328 26

ATTAWAY (J.A.), BARABAS (L.J.), WOLFORD (R.W.) - Analysis of terpène hydrocarbons by thin layer chromatography. Anal. Chem., 1965, 37, 1289-1290 58

BACH (D.) - Cours de Botanique générale. Sédes. Paris 1955. I, p. 323 ; II, p. 195 29

BARGER (G.) - Saponarin, a new glucoside, coloured blue with iodine. J. Chem. Soc., 1906, 89, 1210-1224 24

BASU (H.), RASTOGI (R.P.) - Triterpernoid Saponines and Sapogenins. Phytochemistry G. B. 1969, 6, n°9, 1249-1270 .. 42

BERTHERAND (E.L.) - L'*arenaria rubra* dans la gravelle et le catarrhe vésical. Journal de Pharmacie et de Chimie. 1878, Tome 27, série 4, 485-487 21

BEZANGER-BEAUQUESNE (L.), TRUPIN (N.), GUILBERT (N.), GUISLAIN (R.) - Action cholérétique de quelques flavonoïdes. C.R. Soc. Biol. 1965, 158, n°11, 2095-2100 86

BOITEAU (P.B.P.), RATSINAMANGA (A.R.) - Les triterpènes en physiologie végétale et animale. Gauthier Villard Ed., 1964, 804-809 9

BOUCHE - J. Pharm. Belg., 1955, 10, 169. cité par BOITEAU (P.B.P.) et coll. "Les triterpénoïdes..." (9), p. 805 .. 41

CAMBIE (R.C.) - Identity of Isovitexin ("Homovitexin") and Saponaretin. Chemistry and Industry. January 1959, 17, 87-88 47

CHAUMONT (J.P.) - A propos des polyphénols (flavonoïdes, acides-phénols, coumarines) des capitules de Camomille romaine (*Anthemis nobilis L.*). Plant. med. et phyt. Juillet 1969, 3, n°3, 167-174 83

CHOPIN (J.), ROUX (B.), DURIX (A.) - "Glycosides flavoniques de l'écorce de Citron". C.R. Acad. Sc. Paris 1964, 259, 13, 3111-3113 76

CHOPIN (J.), ROUX (B.), BOUILLANT (M.L.), DURIX (A.), D'ARCY (A.), MABRY (T.), YOSHIOKA (H.) - Structure et synthèse de la di-C-glucosyl 6,8 apigénine du Citron. C.R. Acad. Sc. Paris 1969, 268, 980-982 77

CHOPIN (J.) - Synthesis of C-glycoflavonoids in Pharmacognosy and Phytochemistry. Ed. WAGNER (H.) HORHAMMER (L.), Springer Verlag 1971, 111-128 70

COMPAIN - Le guide de l'herboriste-droguiste. Limoges 1930. cité par TROUARD-RIOLLE (Y.). (6), p. 79 15

COSTE (Abbé H.) - Flore descriptive et illustrée de la France. Klincksieck Ed. Paris 1901, famille des Caryophyllacées I, 168-225 19

D. A. B. 7, 1964, Radix Saponariae, Seifenwurzel. IIIe suppl., 1966 2

DARMOGRAI (V.N.), LITVINENKO (V.I.), KRIVENCHUK (P.E.) - Les glucoflavonoïdes de G. paniculata. Khim prirod Soedim Uzbek SSR. 1968, n°4, 248-249 52

DECAUX (Dr. F.) - Un diurétique injustement oublié : la Sabline rouge ou Aréniaire. (*Arenaria rubra L.*). Revue de Phytothérapie. Janvier 1962, 7-8 14

DULL (P.) - Neue Flavon-C-Glykoside aus Viola tricolor L. und Eupatorium serotinum MICHX. Thèse München 1970 69

EGGER (K.) - Die Analyse der Flavonverbindungen. Planta Medica, Septembre 1964, n°3, 265-271 60

EGGER (K.), KEIL (M.) - Verteilungschromatographische Trennung von Flavongemischen auf Polyamid. Z. Anal. Chem., 1965, 210, n°3, 201-209 61

EGGER (K.), KEIL (M.) - Flavonolglykoside in Renunculaceen. Sonderabdruck aus den Berichten der Deutschen Botanischen Gesellschaft., Jg. 1965, 78, Heft 4, 153-155 .. 62

EGGER (K.), KEIL (M.) - Flavonolglykoside in Renunculaceen, Verbreitung der Glykosidtypen. Sonderabdruck aus den Berichten der Deutschen Botanischen Gesellschaft., Jg 1965, 78, Heft 9, 418-422 63

EGGER (K.) - Hydrophilic plant constituents and their derivatives. In STAHL (E.) Thin layer chromatography (57), 686-706 . 65

Flora europaea. Cambridge. At the university Press. 1964, I, p. 165 18

GARNIER (G.), BEZANGER-BEAUQUESNE (L.), DEBRAUX (G.) - Ressources médicinales de la flore française. Vigot Frères. 1961, Tome I, p. 408 4

GERLACH (H.) - Flavonoïde und ihre Bedeutung für die Pharmazie. Pharmaz. Zent., 1968, 107, n°10, 714-722 85

GOODWIN (T.W.) - Chemistry and biochemistry of plant pigments. Academic Press. London, New-York. 1965, p. 269 44

HARBORNE (J.B.) - The evolution of flavonoid pigments in plants. In Comparative phytochemistry. Ed. SWAIN (T.). Acad. press London. New-York. 1966, chap. 16, 271-296 27

HARBORNE (J.B.) - Comparative Biochemistry of the Flavonoids. Acad. Press. London, New-York. 1967, chap. 10, p. 313... 28

HEGNAUER (R.) - Chemical evidence for the classification of some Plant Taxa. In perspectives in phytochemistry Ed. HARBORNE (J.B.) and SWAIN (T.). Acad. Press. London, New-York. 1969, chap. 6, 121-138 32

HERISSET (A.), CHAUMONT (J.P.), PARIS (R.) - Les polyphénols de la Camomille romaine (*Anthemis nobilis L.*). Plant. med. et phyt. Juillet 1970, 4, n°3, 189-200 84

HERISSET (A.), PARIS (R.R.), CHAUMONT (J.P.) - Les flavonoïdes de la Camomille romaine. Plant. méd. et phyt. 1971, 5, n°3, 234-239 80

HORHAMMER (L.), WAGNER (H.), PROBST (W.) - Naturwissenschaften, 1960, 47, 63. cité par HARBORNE (J.B.) Comp. Biochem. (28) p. 135 43

HORHAMMER (L.) - Ber. XXI, Internat.Kongress Pharmaz. 1961. cité par GERLACH (H.) (85) 82

HORHAMMER (L.), WAGNER (H.) - New phenolic C-glycosides in plants. in Recent developments in the chemistry of natural phenolic compounds. Ed. by W.D. Ollis. Pergamon Press 1961, 185-193 67

HORHAMMER (L.), WAGNER (H.), ROSPRIM (L.), MABRY (T.), ROSLER (H.) - Uber die Struktur neuer und bekannter flavon-C-glycoside. I. Tetrahedron letters 1965, 22, 1707-1711 ... 95

HOROWITZ (R.M.), GENTILI (B.) - Structure of Vitexin and Isovitexin. Chemistry and Industry 1964, 498-499 48

HULTIN (E.), TORSELL (K.) - Alcaloïds screening of swedisch plants. Phytochemistry. 1965, 4, 425-433 54

IBRAHIM (R.K.) - Chromatographic and spectrometric evidence for the occurence of mixed O- and C-flycoflavones in Flax (Linum usitatissimum) cotyledons. Biochim. Biophys. Acta. 1969, 192, 549-552 94

JACOB et coll. - Information thérapeutique, 1963, 6, 19. cité par CALO (A.), CARDINI (C.), QUERCIA (V.). - Séparation, détection et détermination des flavones du *Lespedeza capitata*. Boll. Chim. Farm., 1969, 108, 587-593 89

JURD (L.) - Spectral properties of flavonoid compounds. in The chemistry of flavonoid compounds. Ed. GEISSMAN (T.A.). Pergamon Press. 1962, chap. V, 107-155 75

KALASMKOV, KUTZNETZOV - Farmasiya i Farmacol. 1936. cité par DECAUX (F.) Un diurétique... (14) 39

KHORLIN (A.Y.), BAKINOVSKII (L.V.), VAS' KOVSKII (V.E.), VENYAMINOVA (A.G.), OVODOV (Y.S.) - Saponins of roots of *Gypsophila pacifica*. Isvest. Akad. Nank. SSSR, 1963, 1398, 2008 56

KING (H.G.C.) - Phenolic compounds of commercial wheat germ. J. Food Sci., 1962, 27, 446-457 92

KOBERG (M.) - *Arenaria rubra*. Arch. Pharm., 1936, p. 275. cité par DECAUX (F.) Un diurétique... (14) 40

KROSCHEWSKY (J.R.), MABRY (T.J.), MARKHAM (K.R.), ALSTON (R.E.) Flavonoids from the genus Tragopogon (Compositae). Phytochemistry, 1969, 8, 1495-1498 78

LEBRETON (P.), JAY (M.), VOIRIN (B.), BOUCHEZ (M.P.) - Sur l'analyse qualitative et quantitutive des flavonoïdes. Chimie analytique, 1967, 49, 7, 375-383 59

LECLERC (H.) - Précis de phytothérapie. Masson et Cie. 1966, p. 86 5

LITVINENKO (V.I.), AMANMURADOV (K.), ABUBAKHIROV (N.K.) - Les glucosides de *Vaccaria segetalis*. *IV* : l'isosaponarine. Khim prirod Soedim Uzbek SSR. 1967, n°3, 159-164 51

LITVINENKO (V.I.), DARMOGRAI (V.N.) - Di-C-glycoflavonoïds of Silene conica. Dopov. Akad. Nank Ukr. RSR série B, 1968, 30, n°7, 639-642 50

MABRY (Tom.J.) - The bétacyanins and bétaxanthins. in Comparative phytochemistry. Ed. SWAIN (T.). Acad. Press. London, New-York. 1966, chap. 14, 231-244 30

MABRY (Tom.J.) - The betalains. in Recent advances in Phytochemistry. Vol. I. Ed. MABRY (Tom.J.) Appleton Century crofts. New-York 1968, chap. 4, 145-160 31

MABRY (T.J.) - The ultraviolet and nuclear magnetic resonance analysis of flavonoids. in Perspective in Phytochemistry. Ed. HARBORNE (J.B.) and SWAIN (T.). Acad. Press. London, New-York. 1969, chap. I, 1-45 74

MABRY (T.J.), MARKHAM (K.R.), THOMAS (M.B.) - The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New-York. 1970 66

Mac CLURE (J.W.), ALSTON (R.E.) - A chemotaxonomic study of Lemnaceae. American journal of botany, 1966, vol. 53, 9, 849-860 71

MASCRE (M.), PARIS (R.) - Sur la scoparine (scoparoside) du Sarothamnus scoparius Koch . C.R. Acad. Sc. 1937, 204, 1270-1271. - Sur la constitution du scoparoside (scoparine) du Sarothamnus scoparius Koch . C.R. Acad. Sc. 1937, 204, 1581-1583. - Recherches sur le scoparoside (scoparine) de Sarothamnus scoparius Koch. Bull. Soc. pharmacol., 1937, 44, 401-405 90

MALAPERT (P.P.) - J. Pharm., 1846, série 3, 10, 339-344, cité par GARNIER (G.) et coll. (4) p. 412 23

MELCHERT (T.E.), ALSTON (R.E.) - Flavonoids from the Moss Mnium affine Bland. Science, 1965, 150, 1170-1171 91

MESSEGUE (M.) - Des hommes et des plantes. LAFFONT (R.), 1970 8

MONNIER (P.) - Sysopsis du genre Spergularia (Pers.) Presl. Naturalia monspeliensia, sér. Bot. 1968, fasc. 19, 87-113 38

MOROT (L.) - Recherches sur le péricycle, ou couche périphérique du cylindre central, chez les Phanérogames. Ann. Sciences naturelles (Botanique) 6e série. 1885, 20, 217-309 37

NETIEN (G.) - Contribution à l'étude des glucides et des saponines des Caryophyllacées. Thèse Doctorat Sciences Naturelles. Lyon 1935 34

OCKENDON (D.J.), ALSTON (R.E.), NAIFEH (K.) - The flavonoids of Psoralea (Leguminosae). Phytochemistry, 1966, vol. 5, 601-608 73

PARIS (R.), LYS (P.) - Sur l'origine botanique et la composition chimique du "Polygala de Syrie" (*Spergularia marginata Kittel*). Annales pharmaceutiques françaises. 1954, 12, 171-179 12

PARIS (R.R.), CHARLES (A.) - Sur le "lespécapitoside", flavonoside difficilement hydrolysable des feuilles du Lespedeza capitata Michx. C.R. Acad. Sc. Paris 1962, 254, n°2, 352-353 87

PARIS (R.), MOURY (J.) - Action sur la perméabilité capillaire de divers types de flavonoïdes. A.P.F., 1964, 22, n° 8-9, 489-493 81

PARIS (R.R.), ETCHEPARE (S.) - Sur le "Lespécapitoside" ; son identité avec l'homo-orientine. C.R. Acad. Sci. Paris. 1964, 258, n°24, 6003-6004 88

PARIS (R.R.), MOYSE (H.) - Précis de matière médicale. Masson et Cie. 1967, II, p. 134 10

PARIS (R.), MURGU (L.) - Sur les composés polyphénoliques de *Spiraea crenata L.* Plant. med. et Phyt. 1970, 4, n° 2, 138-149 53

PAX (F.) - Caryophyllacées. in ENGLER (H.G.A.) und PRANTL (K.A.E.) - Die natürlichen Pflantzenfamilien. Ed. W. Engelmann. Leipzig. 1894, III, 1b, 61-94 33

PELT (J.M.) - La place des drogues et principes d'origine végétale en pharmacie. Prod. Probl Pharm. 1966, 21, n°9, 412-428 22

PERKIN (A.G.) - Colouring Matters of the New Zealand Dyewood Puriri, Vitex Littoralis. Part I. J. Chem. Soc., 1878, 73, 1019-1031 45

PERROT (E.) - Matières premières usuelles du règne végétal. Masson. 1943-1944, I, p. 794 16

PERROT (E.), PARIS (R.) - Les plantes médicinales. Presses Universitaires de France. 1971, I, p. 118 17

Pharmacopée française. Codex medicamentarius gallicus.
a - Ed. 1884
b - Ed. 1949
c - Ed. 1965 3

PLANCHON (L.), BRETIN (P.), MANCEAU (P.) - Précis de matière médicale. Libraire Maloine. Paris. 1946, I, p. 886 .. 13

PLOUVIER (V.) - Sur trois glycosides nouveaux. C.R. Acad. Sc. Paris. 1967, 265, 516-519, série D 49

PRESL (J.S.), PRESL (K.B.) - Flora cechica. Indicatis medicinalibus aeconomicis technologicisque plantis. Pragae, Calva, 1819, 8, XIV, 94-95 35

RICHTER (K.) - Systema, genera, species plantarum. Linné. 1840, I, 3293 36

RIBEREAU-GAYON (P.) - Les composés phénoliques des végétaux. Dunod. Paris 1968 64

ROSPRIM (L.) - Uber die Struktur neuer und bekannter Flavon-C-Glykoside. München. November 1966 68

SAKAMOTO (Y.) - Flavones in green tea. Part III : structure of pigments IIIa and IIIb. Agr. Biol. Chem. 1970, 34, n°6, 919-925 93

SEIKEL (M.K.), HOLDER (D.J.), BIRZGALIS (R.) - The flavonoid constituents of Vitex lucens. Arch. of Biochem. Biophys. 1959, 85, 272-295 46

SEIKEL (M.K.), CHOW (J.H.S.), FELDMAN (L.) - The glycoflavonoid pigments of Vitex lucens wood. Phytochemistry 1966, vol. 5, 439-455 72

STAHL (E.) - Thin layer chromatography : A laboratory handbook. 2e Ed. transl. by Ashworth (M.R.F.). Springer Verlag Berlin Heidelberg, New-York 1969, a - p. 241 b - p. 243 . 57

STAMBOULI (A.), PARIS (R.) - Les flavonoïdes du Platane (Platanus occidentalis L.). Isolement du tiliroside à partir des feuilles, et d'hyperoside à partir des inflorescences mâles. Ann. Pharm. Fran., 1961, 19, n°12, 732-739 79

STEINEGGER (E.), HANSEL (R.) - Lehrbuch der Allgemeinen Pharmakognosie. Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg. 1963, p. 240 11

STEINER (M.), HOLTZEM (H.) - Methoden zur Isolierung und Kennzeichnung der Triterpene und einiger Saponine. in PAECH (K.), TRACEY (M.V.) - Moderne Methoden den Pflanzen analyse. Berlin, Göttingen, Heidelberg. Springer 1955. III p. 115 55

TREASE (G.E.) - A textbook of pharmacognosy. Baillière, Tindall and Cox. London 1961, p. 250 1

TROUARD RIOLLE (Y.) - Les plantes médicinales. Flammarion. 1964, p. 79 6

VALNET (J.) - Docteur Nature. Fayard 1971, p. 424 7

VIGIER (F.) - De l'*Arenaria rubra* (sabline rouge) Caryophyllacées. Journal de pharmacie et de chimie. 1879, 29, 4e série, 371-375 20

VIGIER (F.) - VI Repert. Pharm. Paris, 1881, IX. cité par DECAUX (F.) Un diurétique... (14) 38bis

B I B L I O G R A P H I E

Références

TREASE (G.E.) Pharmacognosy, 1961, p. 250 1

D.A.B. 7. 1964, RADIX SAPONARIAE -Seifenwurzel-
IIIe Suppl. 1966 2

Pharmacopée française a) Ed. 1884
b) Ed. 1949
c) Ed. 1965 3

GARNIER (G.) et coll. Ressources médicinales de la flore
française, 1961, I, p. 408 4

LECLERC (H.) Précis phytothérapie, 1966, p. 86 5

TROUARD-RIOLLE (Y.) Les plantes médicinales, 1964, p. 79 6

VALNET (J.) Docteur Nature, 1971, p. 424 7

MESSEGUE (M.) Des hommes et des plantes, LAFFONT, 1970 8

Pharm. frcse, Ed. 1965, p. 831 ..... 3c

BOITEAU (P.B.P.) et coll. Les triterpènes..., 1964, p.804-809.. 9

PARIS (R.R.), MOYSE (H.) "Précis de matière médicale" II, p.134 10

STEINEGGER (E.) et coll. Lehrbuch des Allgemeinen
Pharmacognosie, 1963, p. 240 11

PARIS (R.R.) et coll. Ann. Pharm. frcse, 1954, 12, p. 171-179.. 12

PLANCHON (L.) et coll. Précis de matière médicale, 1946
Tome I, p. 886 13

Pharm. frcse, Ed. 1884, p. 37 ..... 3a

DECAUX (F.) Rev. Phytothérapie, jv. 1952, p. 7-8 14

COMPAIN guide de l'herboriste, 1930, cité par TROUARD-RIOLLE
(Y.) (6), p. 61 15

PERROT (Em.) "Mat. prem....", 1943-1944, I, p. 794 16

PERROT (Em.), PARIS (R.) Les plantes médicinales,
1971, 1, p. 118 17

Flora europaea, 1964, I, p. 155 18
Flore de l'abbé COSTE, 1901, p. 225 19
VIGIER (F.) J. Pharm. Chim., 1879, 29, 4e série, p. 371-375 . 20
BERTHERAND (E.) J. Pharm. Chim., 1878, 27,
4e série, p. 485-487 21
PELT (J.M.) Prod. Probl. Pharm., 1966, 21, n°9, p. 412-428 .. 22
MALAPERT (P.P.) J. Pharm., 1846, 10, 3e série, p. 339-344
cité par GARNIER et coll., p. 412 (4) 23
BARGER (G.) J. Chem. Soc., 1906, 89, p. 1210-1224 24
ALSTON (R.E.) in SWAIN (T.) Comparative phytochemistry, 1966,
chap. 3, p. 36 25
ALSTON (R.E.) in Rec. adv. phytochem., vol.1, 1968, p. 319 .. 26
HARBORNE (J.B.) in SWAIN (T.) Comp. phytochem., 1966,
chap. 16, p. 292 27
HARBORNE (J.B.) Comp. biochem. of flav., 1967,
chap. 10, p. 313 28
BACH (D.) Cours Botanique, Tome II, p. 195
Tome I, p. 323 29
MABRY (Tom J.) in SWAIN (T.) Comp. phytochemistry, 1966,
chap. 14, p. 237-243 30
MABRY (Tom J.) in Rec. adv. phytochem. 1968, p. 159 31
HEGNAUER (R.) in Persp. in phytochem., 1969, p. 124 32
PAX (F.) in ENGLER und PRANTL Die natürlichen
Pflanzenfamilien, III, 1b, p. 61 33
NETIEN (G.) Thèse Doctorat Sciences naturelles, Lyon 1935 ... 34
PRESL (J.S.), PRESL (C.B.) Flora Cechica, 1819, 8, XIV, p.94. 35
RICHTER Systema, Genera, Species Plantarum, LINNE,
1840, p. 437 36
MOROT (L.) Ann. Sciences Nat. (Bot.), 6e série,
1885, 20, p. 281 37
MONNIER (P.) Nat. Monsp., 1968, fasc. 19, p. 87-113 38
VIGIER (F.) VI Repert. Pharm. Paris, 1881, IX, cité par
DECAUX (F.) "Un diurétique..." (14) 38bis

KALASMKOV et KUTZNETZOV Farmasiya i Farmacol., 1937 39
KOBERG (M.) *Arenaria rubra*, Arch. Pharm., 1936, p. 275, articles cités par DECAUX "Un diurétique..." (14) .. 40
BOUCHE J. Pharm. Belg., 1955, 10, p. 169, cité par BOITEAU "Les triterpénoïdes", p. 805 (9) 41
BASU (H.) et RASTOGI (R.P.) Phytochem. G.B. 1969, 6, n°9, p. 1249-1270 42
HORHAMMER (L.), WAGNER (H.), PROBST (W.) Naturwissenschaften, 1960, 47, p. 63, cité par HARBORNE Comp. biochem., p. 135 (28) 43
GOODWIN (T.W.) Chem. Bioch. of plant pigm., 1965, 85, 272-295 44
PERKIN (G.) J. Chem. Soc., 1898, 73, p. 1019-1031 45
SEIKEL (M.K.) et coll. Arch. Biochem. and Biophys., 1959, 85, p. 272-295 46
CAMBIE (R.C.) Chem. and Indus., 1957, p. 87-88 47
HOROWITZ (R.M.), GENTILI (B.) Chem. and Indus., 1964 , p. 498-499 48
PLOUVIER (V.) C. R. Acad. Sc. Paris, 1967, 265, série D, p. 516-519 49
LITVINENKO (V.I.) et coll. Dopov. Akad. Nank Ukr. R S R série B, 1968, 30, n°7, p. 639-642 50
LITVINENKO (V.I.) et coll. Khim. Prirod. Soedim Uzbek S S R., 1967, n°3, 159-164 51
DARMOGRAI (V.N.) et coll. Khim. prirod Soedim. Uzbek S S R., 1968, n°4, p. 248-249 52
PARIS (R.), MURGU (L.) Pl. Med. Phyt., 1970, 4, n°2, 138-149. 53
HULTIN (E.), TORSELL (K.) Phytochemistry, 1965, 4, p.425-433. 54
STEINER (M.), HOLTZEM (H.), in PEACH (K.), TRACEY (M.V.) Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, III, p. 115 .. 55
KHORLIN (A.Y.) et coll. Isvest. Akad. Nank S.S.S.R. 1963, 1398, p. 2008 56

STAHL (E.) Thin layer chromatography, 1969, p. 241
d'après KAUFMANN (H.P.) Fette, Seifen, Anstrichmittel, 1964, 66, p. 461 .... 57a
ATTAWAY (J.A.) et coll., Analytical Chemistry, 1965, 37, p. 1289-1290 58
STAHL (E.) Ouvrage cité p. 243 ..... 57b
LEBRETON (Ph.) et coll. Chim. Anal., 1967, 49, n°7, p. 375-383 59
EGGER (K.) Planta medica, 1964, 3, p. 271 60
EGGER (K.), KEIL (M.) Z. Anal. chem., 1965, 210, n°3, p. 201-209 61
EGGER (K.), KEIL (M.) Sond. Bericht. Deutsch. Bot. Gesell., 1965, 78, n°9, p. 418-422 62
EGGER (K.), KEIL (M.) même revue, 1965, 78, p. 153-155 63
RIBEREAU-GAYON (P.) Les composés phénoliques des végétaux, p. 62 64
EGGER (K.) In Stahl, ouvrage cité (57a), p. 694 65
MABRY (T.J.) et coll., The systematic identification of flavonoïds, p. 4 66
Soluté d'acétate basique de plomb, de la Pharmacopée française, Ed. 1965, p. 1040 ..... 3c
HORHAMMER (L.), WAGNER (H.) in Recent developpement in the chemistry of natural phenolic compounds. Ed. OLLIS Chap. X, p. 187 et 191 67
ROSPRIM (L.) Uber die Struktur neuer und bekannter Flavon-C-Glykoside, 1966, p. 7 et 31 68
DULL (P.) Neue Flavon-C-Glykoside..., 1970, p. 4 et 6 69
CHOPIN (J.) in WAGNER (H.), HORHAMMER (L.), Pharmacognosy and phytochemistry, 1971, p. 111-128 70
Mc CLURE (J.W.), ALSTON (R.E.) Amer. J. Bot., 1966, 53, (9), p. 849-860 71
SEIKEL (M.) et coll. Phytochem., 1966, 5, p. 439-455 72

OCKENDON (D.J.) et coll., Phytochem., 1966, 5, p. 601-608 ... 73
MABRY (Tom J.) In Perspect. in Phytochem., 1969, p. 1-45 74
JURD (L.) in GEISSMAN (T.A.) Chem. of flav. compounds., 1962, chap. 5, p. 107-155 75
STAHL (E.) Ouvrage cité, p. 808, 813, 823, 888 ..... 57c
CHOPIN (J.) et coll. C. R. Acad. Sc. Paris, 1964, 259, 13, p. 3111-3113 76
CHOPIN (J.) et coll., C. R. Acad. Sc. Paris, 1969, 268, p. 980-982 77
KROSCHEWSKY (J.R.) et coll., Phytochem., 1969, 8, p.1495-1498 78
STAMBOULI (A.), PARIS (R.), A.P.F., 1961, 19, n°12, p. 732-739 79
HERISSET (A.) et coll., Plantes méd. et Phyt., 1971, 5, n°3, p. 234-239 80
PARIS (R.), MOURY (J.), A.P.F., 1964, 22, n°8-9, p. 489-493.. 81
HORHAMMER (L.), Ber. XXI, Internat.Kongress Pharmaz. 1961, cité par GERLACH (H.) (85) 82
CHAUMONT (J.P.) Pl. méd. et Phyt., 1969, 3, p. 167-174 83
HERISSET (A.) et coll., Pl. méd. et Phyt., 1970, 4, p.189-200 84
GERLACH (H.) Pharmaz. Zentr., 107, n°10, p. 714-722 85
BEZANGER-BEAUQUESNE (L.) C.R. Soc. Biol., 1965, 158, n°11, p. 2095-2100 86
PARIS (R.) et coll., C.R. Acad. Sc. Paris., 1962, 254, 2, p. 352-353 87
PARIS (R.) et coll., C.R. Acad. Sc. Paris., 1964, 258, p. 6003-6005 88
JACOB et coll., Information thérapeutique, 1963, 6, 19, cité par CALO et coll., Boll. Chim. Farm., 1969, 108, p. 587-593 89
MASCRE (M.), PARIS (r.) C.R. Acad. Sc. 1937, 204, p.1270-1271 p. 1581-1583, Bull. Soc. pharmacol., 1937, 44, 401-415 90

MELCHERT (T.E.) et ALSTON (R.E.) Science, 1965, 150, p. 1170-1171 91

KING (H.G.C.) J. Food Sci., 1962, 27, p. 446-454 92

SAKAMOTO (Y.) Agr. Biol. Chem. 1970, 34, n°6, p. 919-925 . 93

IBRAHIM (R.K.) Biochim. Biophys. Acta, 1969, 192, p. 549-592 94

HORHAMMER (L.), WAGNER (H.), ROSPRIM (L.), MABRY (T.), ROSLER (H.) Tetrahedron letters, 1965, n°22, p. 1707-1711 95